

Title	自然免疫系におけるPumilioタンパク質の機能解析(Dissertation_全文)
Author(s)	成田, 亮
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-01-23
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12899">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.r12899</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

自然免疫系における  
Pumilio タンパク質の機能解析

成田 亮

# 目次

目次.....	2
要旨.....	5
第一章 序論.....	7
1-1        自然免疫と獲得免疫.....	8
1-2        I 型 IFN.....	8
1-3        Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR).....	11
1-4        RIG-I 様受容体(RIG-I-like receptor: RLR).....	14
1-5        細胞内 DNA 認識受容体.....	17
1-6        ストレス顆粒(stress granules: SGs).....	17
1-7        本研究の目的.....	20
第二章 実験材料と方法.....	23
2-1        細胞培養.....	24
2-2        プラスミド、トランスフェクション.....	24
2-3        siRNA および合成核酸.....	24
2-4        抗体および試薬.....	25
2-5        ウイルス感染.....	25
2-6        レポーター法.....	25
2-7        Western Blotting および Native PAGE.....	25
2-8        免疫共沈法.....	26
2-9        定量的リアルタイム PCR (quantitative PCR: qPCR).....	26
2-10        免疫染色法.....	27
2-11        組換え体タンパク精製.....	27
2-12        EMSA (electrophoresis mobility shift assay).....	28
2-13        GST プルダウン法.....	28
2-14        ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	28
第三章 結果.....	29

3-1	過剰発現による PUM1 および PUM2 の I 型 IFN 誘導能の解析.....	30
3-2	Pumilio 点変異体の I 型 IFN 誘導能の解析.....	32
3-3	siRNA を用いた Pumilio 遺伝子発現抑制による機能解析.....	33
3-4	Pumilio と RLR および RLR シグナル分子との相互作用の解析.....	39
3-5	Pumilio 欠損変異体による I 型 IFN 誘導能の解析.....	43
3-6	LGP2 遺伝子発現抑制の Pumilio による I 型 IFN 発現誘導能の解析....	44
3-7	Pumilio の細胞内局在の解析.....	45
3-8	Pumilio 存在下における LGP2 RNA 結合能の解析.....	49
3-9	Pumilio と LGP2 との結合様式の解析.....	54
第四章 考察.....		55
4-1	Pumilio の I 型 IFN 誘導能の解析.....	56
4-2	Pumilio の翻訳抑制と I 型 IFN 産生誘導.....	56
4-3	Pumilio と I 型 IFN 誘導シグナル分子との相互作用.....	57
4-4	Pumilio の細胞内局在と avSGs.....	58
4-5	Pumilio と LGP2 の <i>in vitro</i> における生化学的機能解析.....	59
4-6	今後の展望.....	61
文献.....		62
謝辞.....		68



## 要旨

ウイルスや細菌などの病原体が感染すると、病原体パターン認識受容体がその感染を認識し、自然免疫応答を惹起する。RNA ウイルスの認識に必須の受容体である RIG-I-like receptors (RLRs)は、ウイルスの RNA を認識することにより活性化し、下流のアダプター分子である IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 を介して I 型インターフェロン (IFN)や炎症性サイトカインの産生を誘導する。過剰な I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生は自己免疫疾患の原因となることなどから、RLR シグナルは厳密に制御されているが、その制御機構の全容は明らかではない。今回われわれは、発現クローニング法により I 型 IFN 産生誘導に関わる新規分子として、Pumilio タンパク質を同定した。ヒトの Pumilio タンパク質である PUM1 および PUM2 を過剰発現させると、ニューキャッスル病ウイルス(NDV)感染における IFN- $\beta$ プロモーター活性が上昇し、siRNA を用いてその発現を抑制すると、NDV 感染に応答した I 型 IFN 遺伝子の発現が減少した。また、PUM1/2 と RLR の相互作用を免疫沈降法にて解析したところ、PUM1/2 は laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)と特異的に相互作用していた。免疫染色法により、Pumilio タンパク質は NDV 感染刺激により細胞質で顆粒状の凝集体を形成し、抗ウイルスストレス顆粒に局在していることが明らかとなった。興味深いことに、in vitro における生化学的機能解析から、Pumilio タンパク質は LGP2 の RNA 結合能を上昇させていることが示された。これらのことから、Pumilio タンパク質は LGP2 のウイルス感染認識を制御することにより、I 型 IFN 発現制御に関与していることが明らかとなった。



# 第一章

## 序論



## 序論

### 1-1 自然免疫と獲得免疫

われわれヒトを始めとする高等動物は、自然免疫と獲得免疫という二つの免疫系を協調的に機能させることにより、ウイルスや細菌などの病原体から身を守っている。獲得免疫は体液性免疫と細胞性免疫によって担われており、リンパ球の抗原受容体の遺伝子再構成を行うことにより、抗原特異的な免疫応答を惹起する。また、侵入してきた抗原を記憶することにより再び同じ病原体が感染してきた際には迅速かつ強力な免疫応答を引き起こす。このように獲得免疫は、抗原特異性および免疫記憶という利点を有しているが、その成立には通常数日必要とする。したがって感染初期においては、感染後数時間で発動する自然免疫が病原体の排除に重要である。自然免疫は、病原体に特徴的な構造、すなわち病原体関連分子パターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)をパターン認識受容体(pattern recognition receptor: PRR)が認識することにより惹起され、炎症性サイトカインやⅠ型インターフェロン(interferon: IFN)の産生が誘導される。近年ショウジョウバエにおいて Toll 受容体が発見されたのを皮切りに、多くの PRR が同定され、自然免疫研究は飛躍的に発展した[1,2]。

### 1-2 Ⅰ型 IFN

IFN はウイルス感染細胞から分泌され、ウイルスの感染や増殖を抑制する液性因子として 1950 年代に発見された[3,4]。現在では、複数の IFN- $\alpha$ と単一の IFN- $\beta$ などからなるⅠ型、IFN- $\gamma$ からなるⅡ型および IFN- $\lambda$ からなるⅢ型の3種類に分類され、それぞれ異なる受容体に結合して作用する(図 1-1)[5,6]。

Ⅰ型およびⅢ型 IFN はウイルス感染刺激に応答して樹状細胞や繊維芽細胞などから産生される[7]。産生された IFN は細胞外に放出され、細胞膜上に局在する IFN 受容体に結合することによって、産生細胞のみならず、周囲の細胞にも IFN シグナルの活性化をもたらす[8]。Ⅰ型 IFN 受容体は interferon alpha receptor 1 (IFNAR1)と IFNAR2 のヘテロ二量体によって構成される。分泌されたⅠ型 IFN が受容体に結合すると、janus kinase 1 (JAK1)と tyrosine kinase 2 (Tyk2)というキナーゼが活性化され、転写因子である signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)、STAT2 がリン酸化される。リン酸化された STAT1/2 はヘテロ二量体となり、さらに IFN regulatory factor-9 (IRF-9)と結合し interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3)と呼ばれる三量体を形成する。その後 ISGF3 は核内に移行し、interferon stimulated response element (ISRE)と呼ばれる

配列に結合することで、数百にも及ぶ IFN 誘導遺伝子(interferon stimulated gene: ISG)の転写を誘導する。III 型 IFN 受容体は interleukin (IL) -10 receptor  $\beta$ と IL-28 receptor  $\alpha$  のヘテロ二量体から形成される。I 型 IFN 受容体と同様に、III 型 IFN の結合により JAK1、Tyk2 が活性化され、STAT1/2 のリン酸化が誘導される。STAT1/2 ヘテロ二量体は IRF-9 と結合することにより三量体 ISGF3 となり、核内に移行して ISRE に結合する。

一方、II 型 IFN はナチュラルキラー細胞や CD4 陽性 Th1 細胞などから産生され、主に獲得免疫で機能している。II 型 IFN 受容体は interferon  $\gamma$  receptor 1 (IFNGR1)と IFNGR2 のヘテロ二量体から構成される。II 型 IFN が受容体に作用すると、JAK1、JAK2 が活性化され、STAT1 がリン酸化される。リン酸化された STAT1 はホモ二量体 (gamma activated factor: GAF)を形成し、核内に移行する。STAT1 ホモ二量体は interferon- $\gamma$ -activated site (GAS)と呼ばれる配列に結合し、ISG の転写を誘導する。

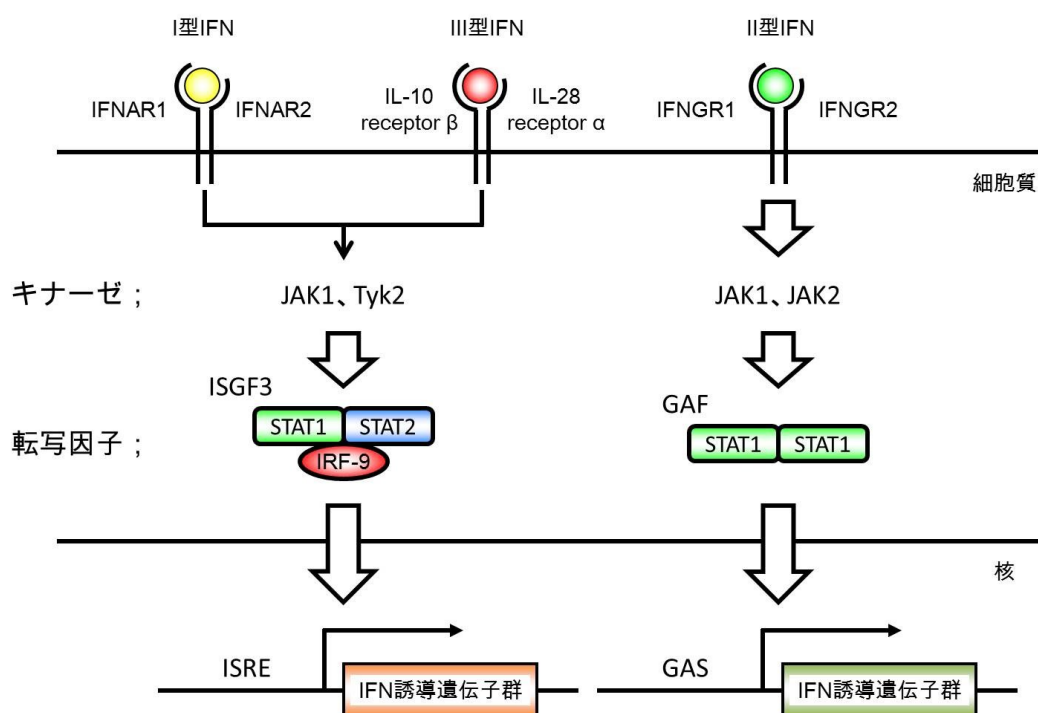


図 1-1 各 IFN 受容体とそのシグナル経路

IFN 受容体は三種類存在し、それぞれ IFNAR1 と IFNAR2 (I 型 IFN)、IFNGR1 と IFNGR2 (II 型 IFN)、IL-10R $\beta$  と IL-28R $\alpha$  (III 型 IFN)のヘテロ二量体で構成される。I 型および III 型 IFN がそれぞれの受容体に結合すると、JAK1、Tyk2 が活性化され、STAT1、STAT2 および IRF-9 から構成される ISGF3 が形成される。ISGF3 は核内に移行した後 ISRE に結合し、ISGs の転写を誘導する。一方、II 型 IFN は JAK1、JAK 2 が STAT1、STAT2 から成る GAF の形成を誘導し、核内で GAS に結合して ISGs の転写を誘導する。

IFN 遺伝子の発現はプロモーター領域に結合する転写因子によって厳密に制御されている。中でも最も詳しく研究されている IFN- $\beta$  遺伝子のプロモーター領域には、IRF、activating transcription factor (ATF)/c-jun、nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)の結合配列(positive regulatory domain (PRD) I~IV))が並んで存在し、IFN- $\beta$  遺伝子の発現誘導はこれらの転写因子によって厳密に制御されている[9]。また、IFN- $\alpha$  遺伝子群のプロモーター領域は IRF の結合配列のみが存在する(図 1-2)。

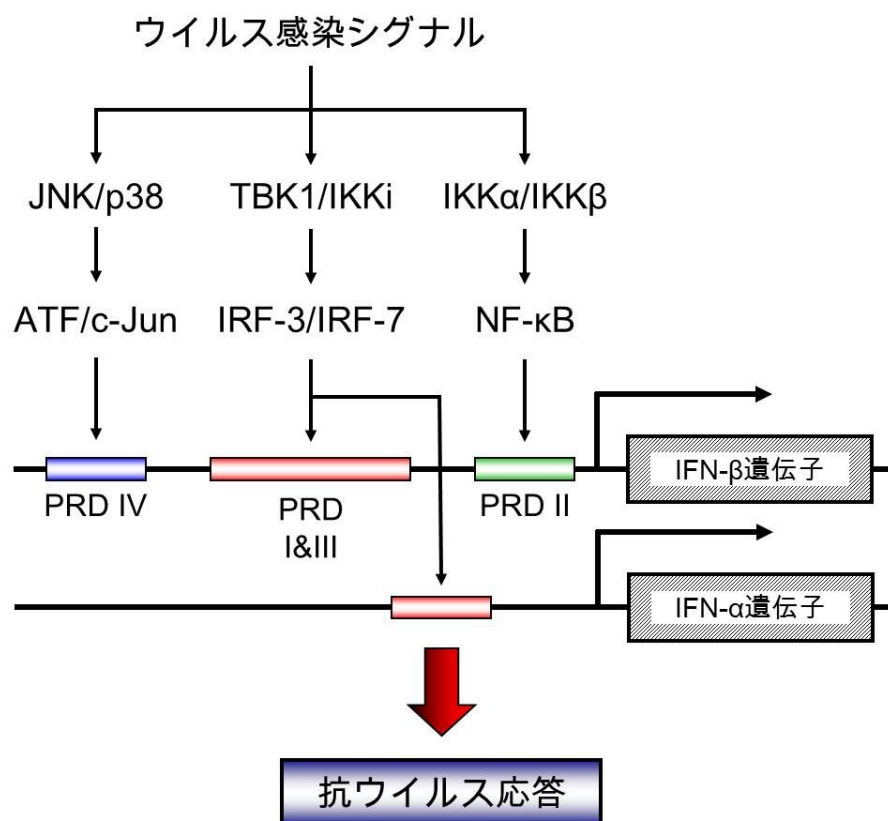


図 1-2 I 型 IFN 遺伝子の発現制御機構

ウイルス感染に応答して、JNK/p38、TBK1/IKKi、IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  といったキナーゼが活性化され、それぞれ ATF/c-Jun、IRFs、NF- $\kappa$ B といった転写因子を活性化する。IFN- $\beta$  のプロモーター領域にはこれら全ての結合領域が並んで存在するが、IFN- $\alpha$  のプロモーター領域には IRFs 結合配列のみが存在する。誘導された I 型 IFN は細胞外に放出され、周囲の細胞に抗ウイルス状態をもたらす。

ヒトゲノム中には9種類のIRF (IRF-1~9)がコードされており、IFN 遺伝子の発現誘導にはIRF-3とIRF-7が必須である。IRF-3とIRF-7は様々な組織に発現しており、定常状態においては不活性型の単量体で存在する。IRF-3/7はウイルス感染に応答して、TANK binding kinase 1 (TBK1)および inducible I $\kappa$ B kinase (IKKi)によって特定のセリン残基がリン酸化され、ヘテロ二量体を形成して核に移行する。その後補助因子である CREB binding protein (CBP)/p300 と複合体を形成し、プロモーター領域に結合して遺伝子の転写を誘導する。IRF-3は定常状態で高い発現を示しているのに対して、IRF-7は定常状態における発現量は低く、また、IFNによって発現が誘導されるISGであることから、IFN 遺伝子発現誘導の二次的な役割を担っていると考えられていた。ところが、IRF-7 遺伝子欠損マウスの解析の結果、I型IFN 遺伝子の発現誘導がIRF-7 依存的に起こっていることが明らかとなり、IRF-3だけでなくIRF-7も感染初期のI型IFN 発現誘導に必須であることが明らかとなった。

NF- $\kappa$ Bはp65とp50のヘテロ二量体で構成され、定常状態においてはinhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)の結合により不活性状態に保たれている。ウイルス感染刺激等に応答してIKK  $\alpha/\beta/\gamma$ 複合体がI $\kappa$ Bをリン酸化することにより、I $\kappa$ Bはユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。I $\kappa$ Bから遊離したNF- $\kappa$ Bは活性型となって核に移行し、IFN 遺伝子の転写を誘導する。

ATF/c-junはJNK/p38といったmitogen-activated protein kinase (MAPK)によって制御されているが、その詳細な分子機構は明らかとなっていない。

### 1-3 Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)

ショウジョウバエのToll受容体の相同遺伝子として、哺乳類でもTLRが同定され、その機能が次々と報告された。現在ヒトでは10種類のTLRが報告されている。TLRは一回膜貫通型受容体であり、細胞外にleucine rich repeat (LRR)が存在し、細胞内にはToll/IL-1R 相同領域(Toll/IL-1R homology (TIR) domain)が存在する[1]。TLRは細胞外のLRRでウイルスや細菌の核酸や構成物を認識し、アダプター分子であるmyeloid differentiation factor 88 (MyD88)もしくはTIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$  (TRIF)を介してシグナルを下流に伝達する(図1-3、4)。TLR3を除くTLRを介した炎症性サイトカインの発現誘導に必須の分子であるMyD88は、リガンドの結合によりIL-1R-associated kinase-1 (IRAK-1)およびIRAK-4と複合体を形成し、TNFR-associated factor 6 (TRAF6)、TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1)、IKK $\alpha/\beta/\gamma$ と繋がる一連のカスケードを活性化する。最終的にNF- $\kappa$ Bが活性化され、IL-6などの炎症性

サイトカインの遺伝子発現が誘導される。一方、TLR3、TLR4、TLR7 および TLR9 はリガンド刺激により、炎症性サイトカインのみならず、I 型 IFN の産生も誘導する。TRIF は TLR3 による炎症性サイトカインおよび I 型 IFN 産生誘導に必須の分子であり、TLR3 リガンド刺激により、TRIF は receptor-interacting protein 1 (RIP1) との結合を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。一方、TRIF は TBK1 および IKKi を介して IRF-3/7 を活性化することにより、I 型 IFN の産生を誘導する。TLR4 においては、TRIF に加え別のアダプター分子である TRIF-related adaptor molecule (TRAM) が I 型 IFN 産生誘導に関与している。また、TLR7 および TLR9 においては、MyD88 が炎症性サイトカインおよび I 型 IFN 産生誘導に重要な役割を担っており、TLR7/9 刺激により、MyD88、IRAK-1/4、TRAF6 および IRF-7 が複合体を形成し、NF- $\kappa$ B および IRF-7 を活性化する。

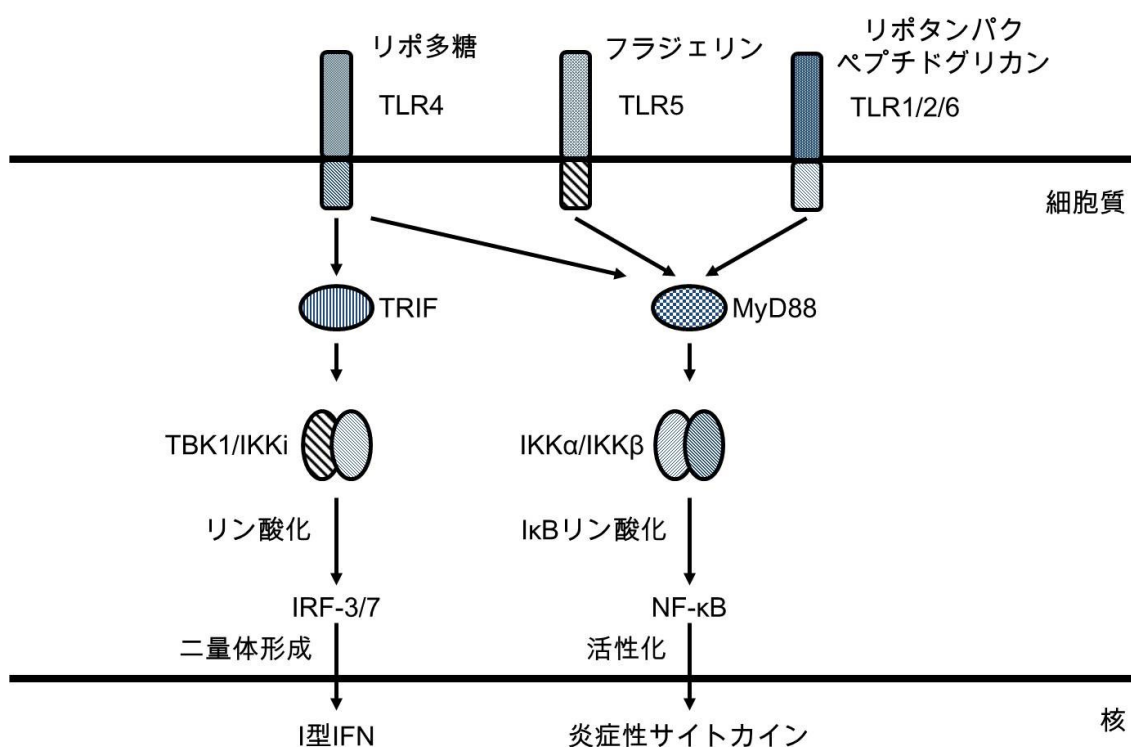


図 1-3 TLR1/2/6、4、5 によるシグナル伝達経路

TLR1/2/6 はリポタンパクやペプチドグリカン、TLR4 はリポ多糖、TLR5 はフラジエリンをそれぞれ認識する。これらリガンドが TLRs に結合すると、MyD88 依存的に IKKα/IKKβ が活性化され、NF- $\kappa$ B を介して炎症性サイトカインの産生が誘導される。また、TLR4 は TRIF 依存的に TBK1/IKKi を活性化させ、IRF-3/7 を介した I 型 IFN の産生も誘導する。

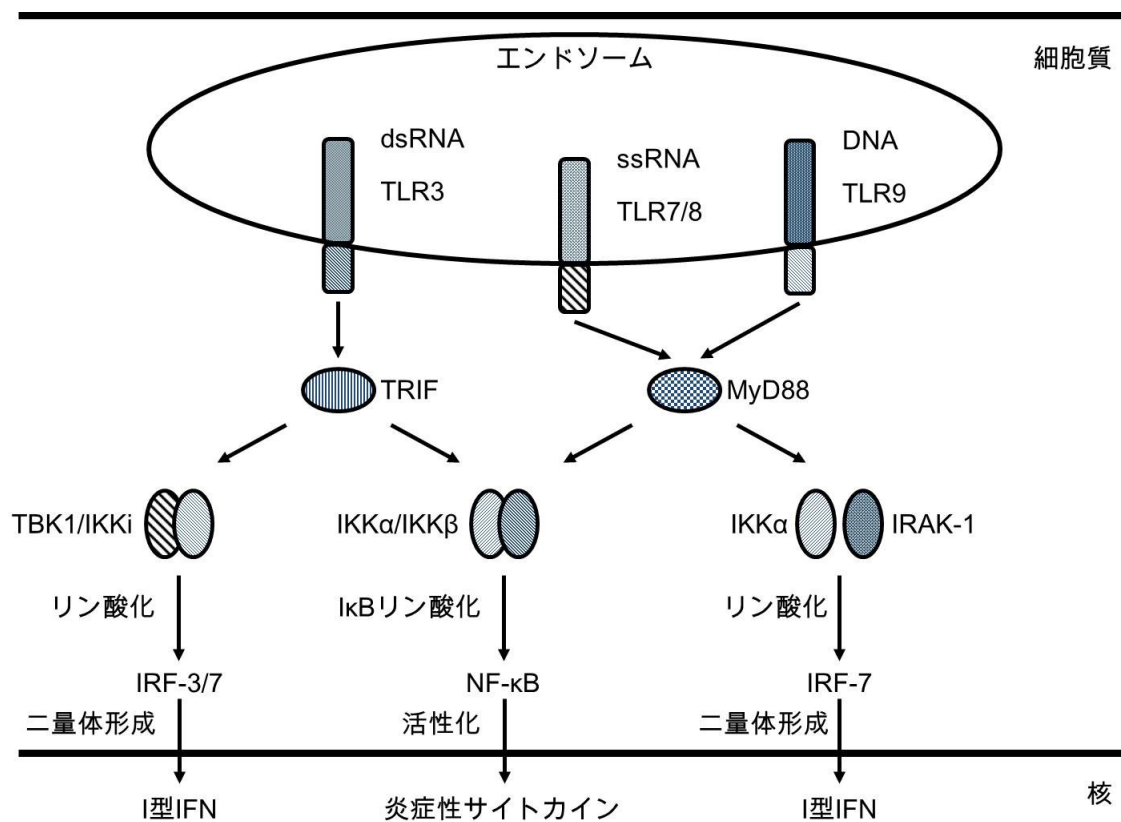


図 1-4 TLR3、7/8、9 によるシグナル伝達経路

TLR3 は dsRNA を、TLR7/8 は ssRNA を、TLR9 は非メチル化 DNA をそれぞれ認識する。これらの TLRs は主にエンドソームに局在している。TLR3 は TRIF 依存的に TBK1/IKKi および IKKα/IKKβ を活性化し、それぞれ I 型 IFN および炎症性サイトカインの産生を誘導する。一方 TLR7/8、9 は MyD88 依存的に IKKα/IKKβ および IKKα/IRAK-1 を活性化し、それぞれ炎症性サイトカインおよび I 型 IFN の産生を誘導する。

#### 1-4 RIG-I 様受容体(RIG-I-like receptor: RLR)

TLR は細胞膜上やエンドソームに局在していることから、細胞外のウイルスや細菌などを認識している。細菌やウイルスなどは、宿主細胞内に侵入し増殖することから、細胞内でこれらの感染を検知し、I 型 IFN の産生を誘導する受容体の存在が示唆されていた。また、実際 TLR3 欠損細胞においても、ウイルス感染による I 型 IFN の産生が誘導されることが明らかとなっていた[10]。Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)は細胞内でウイルス感染を認識し、I 型 IFN の産生を誘導する受容体として同定された[11]。

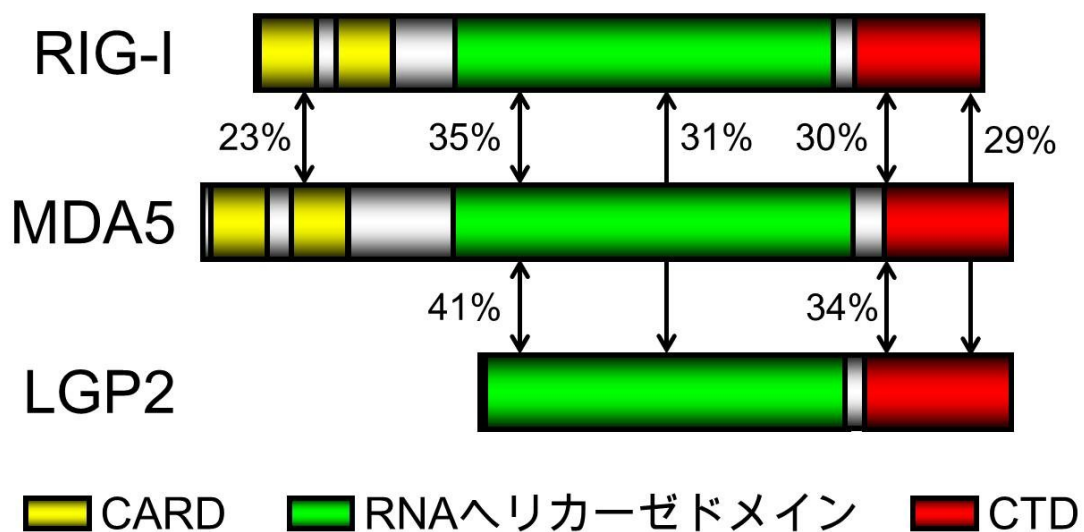


図 1-5 RLRs のドメイン構造

RIG-I および MDA5 は N 末端の CARD、中央の RNA ヘリカーゼドメインおよび CTD から構成される。一方、LGP2 は RNA ヘリカーゼドメインと CTD から構成される。%は各ドメインのアミノ酸の相同性を示す。

RIG-I は DExD/H 型 RNA ヘリカーゼであり、その遺伝子配列の相同性から、melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) および laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) が同定され、RIG-I と同様に細胞内ウイルス感染認識受容体として機能していることが明らかとなった[12,13,14,15]。RIG-I と MDA5 は非常によく似た一次構造をしており、N 末端の caspase activation and recruitment domain (CARD)、中央の RNA ヘリカーゼドメイン、C 末端領域(C-terminal domain; CTD)から構成される。一方、LGP2 は N 末端の CARD を欠損しており、RNA ヘリカーゼドメインと CTD から構成される。ウイルス非感染時には、RIG-I、MDA5 は不活性型で存在しており、ヘリカーゼドメインによって CARD が露出しない構造をとっている。一方、ウイルス感染時には、ウイルス由来の RNA をヘリカーゼドメインおよび CTD を介して認識することにより、CARD が露出する。RIG-I、MDA5 は共に RNA に沿ってフィラメント状の構造体を形成し[16,17]、ミトコンドリア外膜に局在する下流のアダプター分子 interferon- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1、別名 MAVS、VISA、Cardif)を介して下流にシグナルを伝達する[18,19,20,21,22,23]。RIG-I、MDA5 からシグナルを受け取った IPS-1 は、TBK1/IKK-i、IKK- $\alpha/\beta$  を介して転写因子である IRF-3/7 および NF- $\kappa$ B をそれぞれ活性化し、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する。RLR と同様に、IPS-1 もまたウイルス感染刺激に応答して凝集体を形成することが明らかとなっている[24,25]。通常ミトコンドリア上に均一に局在している IPS-1 だが、ウイルス感染時には、特定のミトコンドリア上に集積し、凝集体を形成する。ミトコンドリアは絶えず分裂と融合を繰り返しており、様々なタンパクによって制御されている。この IPS-1 の凝集もまた、ミトコンドリアの融合を制御する因子である mitofusin 1 (MFN1)や optic atrophy 1 (OPA1)などによって制御されていることが近年報告された[26]。

遺伝子欠損マウスの解析により、RLRs はそれぞれ異なるウイルス感染の検知に重要であることが示された[13]。RIG-I はセンダイウイルス(Sendai virus: SeV)やニューキャッスル病ウイルス(Newcastle disease virus: NDV)などパラミクソウイルス科のウイルスやインフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルスなどを認識するのに対して、MDA5 は脳心筋炎ウイルス(Encephalomyocarditis virus: EMCV)を初めとするピコルナウイルス科のウイルス感染に必須である。また、シグナル伝達に必要な CARD を持たず、in vitro における RNA 結合能が RIG-I および MDA5 よりも強いことから、当初 RLR シグナルの負の調節因子と考えられていた LGP2 も、遺伝子欠損マウスの解析により、EMCV、SeV、NDV などのウイルス感染に正の調節因子として機能していることが明らかとなった[14]。これらウイルスによる受容体の使い分けの分子機構は明らかとなっていない



が、二重鎖 RNA の長さや 5'末端構造など、RLR の認識する RNA の違いが一因となっている可能性が示唆されている。認識する RNA の違いとはすなわち、RIG-I は 5'末端に三リン酸を持つ RNA (5'pppRNA) や 1 kb 以下の短い dsRNA など認識して I 型 IFN 産生を誘導するが、MDA5 は高次構造を持った dsRNA や 1 kb 以上の長い dsRNA など認識しているということである[27,28,29,30]。一方、LGP2 は前述の通り RIG-I や MDA5 より強い RNA 結合能を示し、in vitro における解析の限りでは、5'pppRNA や dsRNA 一般に強く結合することが知られている[15,31]。また、LGP2 の I 型 IFN 産生誘導機構が明らかでないこともあり、その生理的なリガンド RNA は判明していないが、最近、EMCV のアンチセンス RNA が LGP2 によく結合していることが報告された[32]。

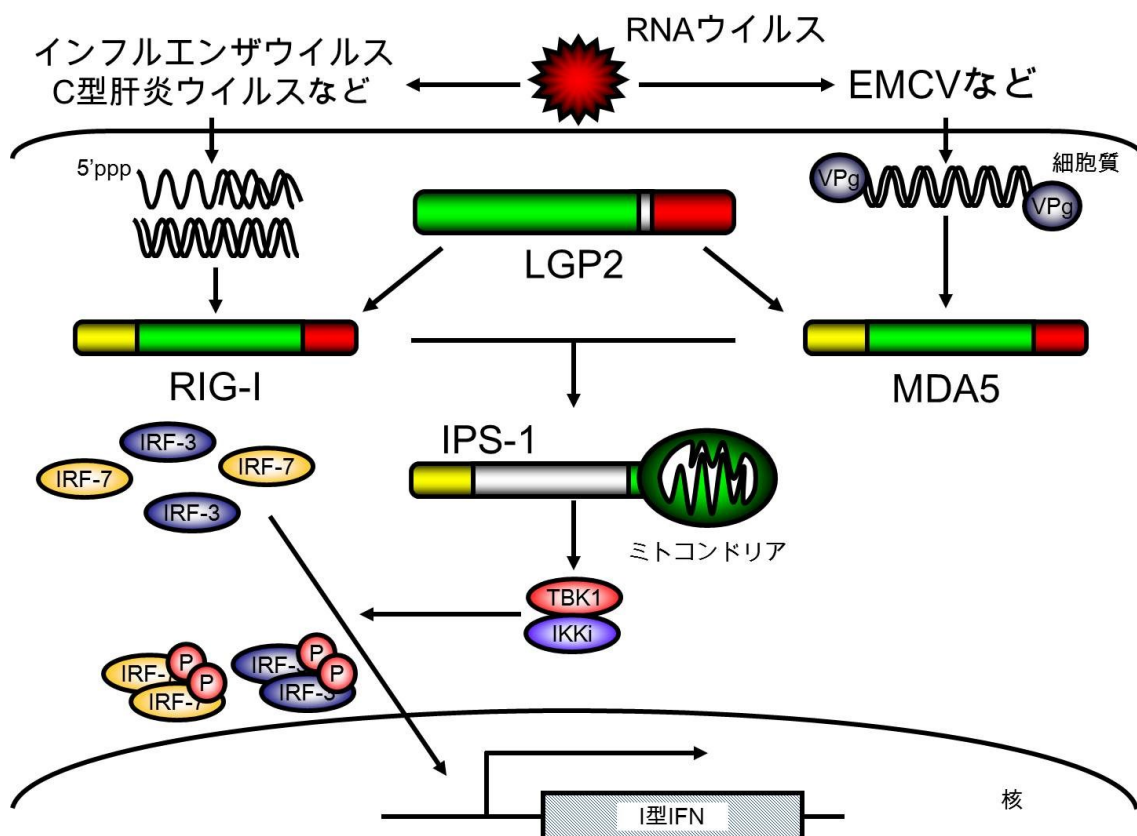


図 1-6 RLR シグナル経路

RIG-I はインフルエンザウイルスや C 型肝炎ウイルスなど、MDA5 は EMCV やタイラーウイルスなどの感染を検知し、IPS-1 を介して I 型 IFN の産生を誘導する。LGP2 は RIG-I および MDA5 シグナルの正の制御因子として機能しているが、その分子機構は明らかとなっていない。

前述の通り I 型 IFN はウイルス感染時に誘導され、ウイルス非感染時にはほとんど発現していない。過剰な、もしくは恒常的な I 型 IFN 産生は宿主に有害であり、自己免疫疾患の原因ともなりうる[33]。実際、MDA5 の恒常活性型変異は全身性エリテマトーデスやアイカルディ・ゴーティエ症候群の原因の一つということが明らかとなっている[34,35]。そのため、I 型 IFN の産生を誘導する RLR シグナルは様々な分子によって厳密に制御されていることが知られている[36]。tripartite motif containing 25 (TRIM25)は RIG-I の CARD をユビキチン化する。このユビキチン化は RIG-I が下流にシグナルを伝達するのに必須である[37]。また、ring finger protein 135 (RNF135、別名 Riplet)は RIG-I の CTD をユビキチン化することにより、RIG-I の活性化における正の調節因子として機能している[38,39]。一方、TRIM25、RNF135 と同じく E3 ユビキチンリガーゼである RNF125、A20、脱ユビキチン化酵素である DUBA、CYLD は RIG-I シグナルの負の調節因子であることが報告されている[40,41,42,43]。さらに、in vitro における解析により、RIG-I、MDA5 の活性化には遊離ポリユビキチン鎖の結合が必須であることが明らかとなった[44]。

#### 1-5 細胞内 DNA 認識受容体

RLR は細胞内で非自己 RNA を認識する受容体として機能しているが、ウイルスや細菌などの非自己 DNA もまた細胞内で検知され、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する[45]。

細胞内 DNA 認識受容体としては、DNA-dependent activator of IFN regulatory factors (DAI、別名 ZBP1)、interferon, gamma-inducible protein 16 (IFI16)、DEAD box polypeptide 41 (DDX41)などが報告されており、アデノウイルスや単純ヘルペスウイルスなどの感染に応答して、stimulator of IFN genes (STING)や TBK1、IRF-3 を介して I 型 IFN 産生を誘導するとされている[46,47,48]。

最近、cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)がウイルスや細菌の DNA を認識して I 型 IFN の産生を誘導することが報告された[49,50]。cGAS は非自己 DNA に結合し、GTP および ATP から cGAMP (環状 GMP-AMP)を合成する。合成された cGAMP は小胞体に局在する STING によって認識され、TBK1 および IRF-3 を介して I 型 IFN 産生が誘導される。遺伝子欠損マウスの解析により、cGAS は単純ヘルペスウイルスやワクシニアウイルス、ヒト免疫不全ウイルスの感染認識受容体であることが明らかとなった[51]。

#### 1-6 ストレス顆粒(stress granules; SGs)

ストレス顆粒はウイルス感染や酸化ストレス、異常タンパク質蓄積などによって細胞質に一過的に形成される凝集体であり、mRNA、RNA 結合タンパク質、40S リボソームなどから構成される[52,53]。ストレス顆粒は種々のストレスから mRNA を保護するために形成されると考えられており、ハウスキーピング遺伝子等の mRNA がストレス顆粒に取り込まれ、その翻訳は一時的に停止する。一方で、分子シャペロンや損傷修復に関与するタンパク質をコードする遺伝子の mRNA の翻訳は促進されている。ストレス顆粒は膜を持たない構造体であるため、その凝集は動的かつ一過的であり、細胞がストレスから回復すると消失し、ストレス顆粒に取り込まれていた mRNA の翻訳は開始される。

ストレス顆粒は定常状態においてはその形成が確認できないが、細胞が種々のストレスにさらされると急速に形成される。その形成には protein kinase RNA-activated (PKR)、PKR-like ER kinase (PERK)、GCN2、heme-regulated inhibitor (HRI)といったキナーゼによる eukaryotic initiation factor 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )のリン酸化が必須であることが知られている(図 1-7)。eIF2 $\alpha$ のリン酸化は eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup>複合体を mRNA から解離させ、RNA 結合タンパク質である T-cell internal antigen-1 (TIA-1)および TIA-1-related protein (TIAR)の開始複合体への結合を促進する。TIA-1 および TIAR の結合は、ポリソームの開始複合体からの解離を誘導し、最終的に mRNA を含む複合体はストレス顆粒へ取り込まれる。ストレス顆粒に含まれる RNA 結合タンパク質としては、TIA-1、TIAR の他、GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1 (G3BP1)、poly (A)+ binding protein 1 (PABP1)などが知られている。

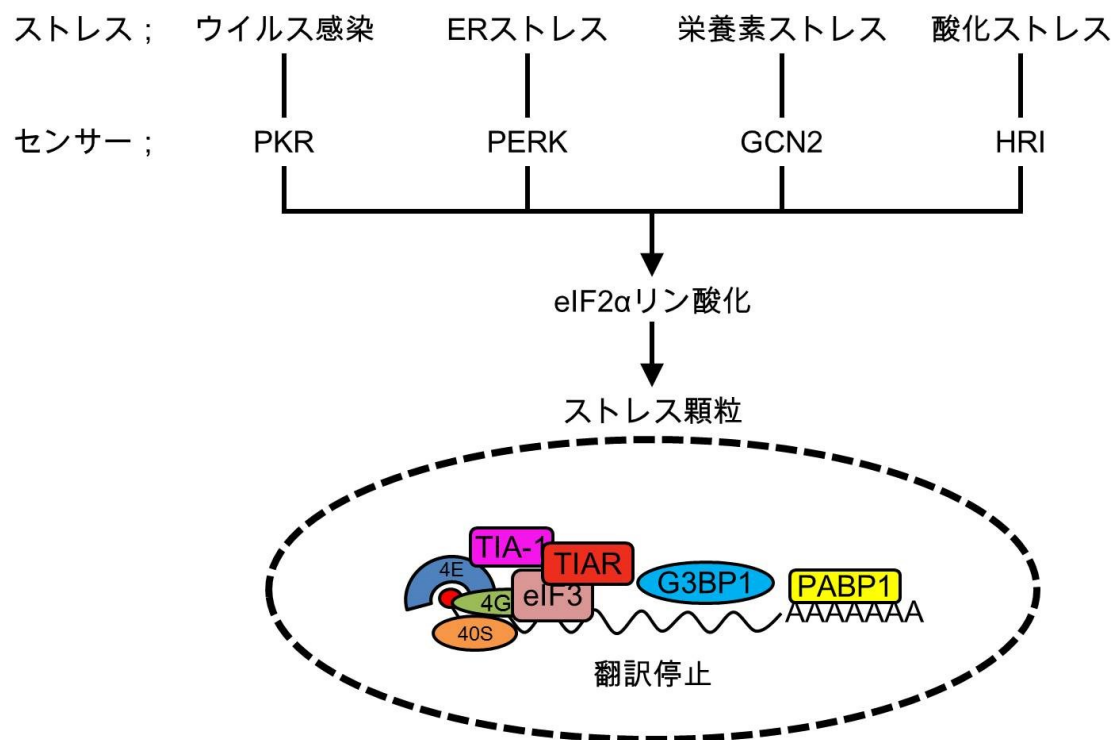


図 1-7 ストレス顆粒形成シグナルとその構成因子

ウイルス感染や酸化ストレスなどのストレスは、PKR、PERK、GCN2 および HRI によって検知され、eIF2α のリン酸化が誘導される。eIF2α のリン酸化は eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> 複合体およびポリソームの解離を経て mRNA のストレス顆粒への凝集を誘導する。

最近われわれは、ウイルス感染刺激によって RLRs が細胞質で顆粒状に集積し、ウイルス RNA や抗ウイルスタンパク質である PKR や DHX36、RNase L などと共局在することを明らかにした[54,55]。この RLR の凝集体は、TIAR や G3BP といったストレス顆粒の構成因子と共局在することから、抗ウイルスストレス顆粒(antiviral stress granules: avSGs)と呼ばれる。抗ウイルスストレス顆粒の形成を阻害するとウイルス感染に応答した I 型 IFN の産生が減弱すること、抗ウイルスストレス顆粒にはウイルス RNA の他、RIG-I の活性化に必須の TRIM25 も局在していることから、RLRs によるウイルス RNA 検知の場となっていると考えられている。

#### 1-7 本研究の目的

われわれは、発現クローニング法を用いて RIG-I を同定したが、その際ヒト Pumilio タンパク質である PUM1 および PUM2 を I 型 IFN 発現誘導に関わる分子として同定した(図 1-8)。

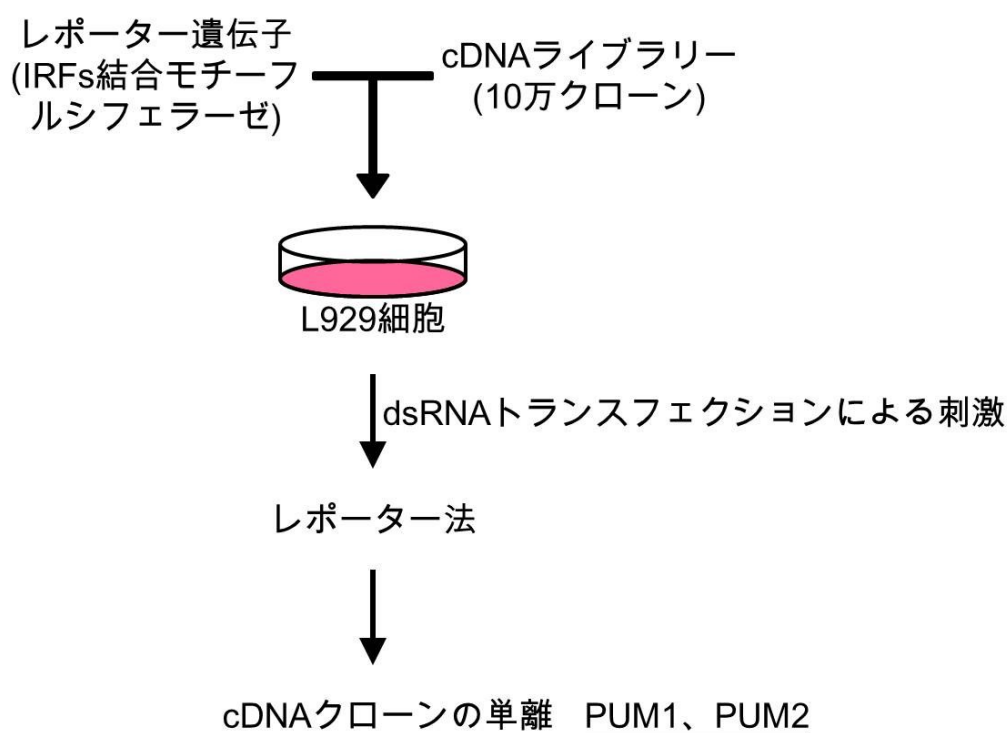


図 1-8 発現クローニング法の概要

cDNA ライブラリーをレポーター遺伝子と共に L929 細胞にトランスフェクションし、dsRNA トランスフェクションで刺激した後、レポーター法により cDNA クローンの単離を行った。

Pumilio は哺乳類から植物まで広く保存されている分子であり、ヒトでは 2 種類 (PUM1、PUM2) 存在する(図 1-9)。Pumilio は当初、ショウジョウバエにおいて特定の mRNA の 3' untranslated region (3'UTR) に結合してその翻訳を抑制する因子として同定され、胚発生、幹細胞分化、細胞周期、ミトコンドリア生合成など様々な過程に関与していることが知られている[51,56,57,58,59]。Pumilio はその C 末端領域に高度に保存された Pumilio-homology domain (PUM-HD) と呼ばれる RNA 結合領域を持つ。PUM-HD は 3 つの  $\alpha$ -ヘリックスから成る 8 つの繰り返し配列から構成されており、それぞれのドメインが一つの塩基を認識している。Pumilio は UGUANAUA (N は任意の塩基) という配列を認識して結合する。Pumilio C 末端領域の PUM-HD はその機能が詳しく解析されている一方、Pumilio の N 末端領域の機能はほとんど明らかとなっていない。

最近の報告で、シロイヌナズナの Pumilio タンパク質の一つである APUM5 がキュウリモザイクウイルスの 3'UTR に結合し、その翻訳を抑制していることが明らかとなった[60]。このことは、Pumilio タンパク質の翻訳抑制能が抗ウイルス応答においても機能していることを示しているが、翻訳抑制能と独立した Pumilio タンパク質による I 型 IFN 産生誘導はこれまで明らかとなっていなかった。本研究では、RLR シグナル調節機構を詳細に明らかにすることを目的とし、Pumilio がどのようにして I 型 IFN 発現誘導に関わっているのか、その詳細な分子機構の解析を行った。

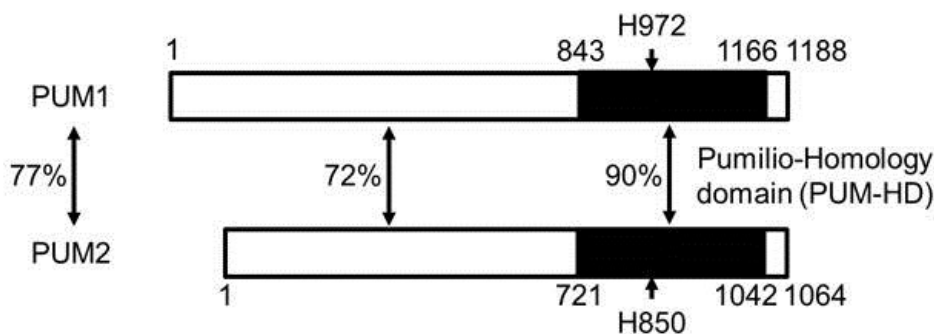


図 1-9 ヒト PUM1 と PUM2 の一次構造

ヒト PUM1 と PUM2 の一次構造を示す。数字はアミノ酸番号、%はアミノ酸配列の相同性を示す。H972 および H850 は RNA 結合に重要なヒスチジン残基を示す。



## 第二章

### 実験材料と方法



## 実験材料と方法

### 2-1 細胞培養

LGP2 欠損マウス由来の胚性繊維芽細胞(mouse embryonic fibroblast: MEF)および野生株は大阪大学免疫学フロンティア研究センターの審良静男教授より分与していただいた。マウス繊維芽細胞由来 L929 細胞は 5%fetal bovine serum (FBS)および penicillin-streptomycin (PC/SM: ナカライテスク)を添加した minimum essential medium (MEM; ナカライテスク)を用いて培養した。ヒト胎児腎細胞由来 HEK293T 細胞、ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞および MEF 細胞は 10%FBS および PC/SM を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: ナカライテスク)を用いて培養した。

### 2-2 プラスミド、トランスフェクション

pEF-BOS-Flag-PUM1/2 は、HeLa 細胞から抽出した total RNA を逆転写して作製した cDNA を鋳型に、Flag タグを付加したプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR)を行い、pEF-BOS に挿入して作製した。pEF-BOS-Flag-PUM1/2 dC/N および pEF-BOS-Flag-PUM1H972A、PUM2H850A 変異体は、それぞれ野生型プラスミドを鋳型に、KOD plus mutagenesis kit (TOYOBO)を使用して作製した。後述のレポーター法で使用したレポータープラスミド(p-125Luc、p-55C1BLuc および p-A2Luc)および shRNA 発現プラスミド(pU6i-control、pU6i-LGP2#1 および#2)は以前に報告したものを使用した[15]。

DNA トランスフェクションには Lipofectamine 2000 (invitrogen)を、RNA トランスフェクションには Lipofectamine RNAiMAX (invitrogen)を添付のプロトコルに従って使用した。

後述のレポーター法においては、DEAE-デキストラン法で DNA のトランスフェクションを行った。10 mg/ml DEAE-dex (PK Chemical) 25  $\mu$ l に 0.625  $\mu$ g の発現プラスミドおよびレポータープラスミド、5 ng の内在性コントロールプラスミド(pRL-tk: Promega)を加え、vortex して攪拌した。37°Cで 15 分間静置した後、培地を Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; GIBCO)/10%Nu-Serum (BD)、150  $\mu$ M クロロキンに交換し、混合液を添加した。37°Cインキュベーターで 90 分培養後、培地を通常の MEM/5%FBS、PC/SM へ戻し、以降の操作を行った。

### 2-3 siRNA および合成核酸

ネガティブコントロール siRNA (siN.C.)および PUM1/2 siRNA は株式会社ボナックより購入した。poly I:C は東レ株式会社から分与していただいた。poly dA:dT は SIGMA から購入したものを使用した。5'pppRNA は以前報告した方法で合成し使用した[61]。

#### 2-4 抗体および試薬

抗 Flag 抗体、抗 c-myc 抗体、抗 GST 抗体、抗 PUM1 および PUM2 抗体、抗 TIAR 抗体、抗 $\beta$ -アクチン抗体、マウス IgG は Santa Cruz 社から購入した。抗 HA 抗体は Cell signaling technologies 社から購入した。抗 NDV-NP 抗体は広島大学大学院医歯薬総合研究科の坂口剛正教授より分与していただいた。抗 RIG-I 抗体、抗 MDA5 抗体、抗 LGP2 抗体および抗 IRF-3 抗体は以前に報告したものを使用した[15,54,62]。ヒト IFN- $\beta$ は東レ株式会社から分与していただいたものを使用した。

#### 2-5 ウイルス感染

NDV は鶏卵の尿膜腔に注射して増殖させ、奨尿液を回収してウイルス原液とした。10%FBS を含まない培地(MEM もしくは DMEM)に NDV を希釈して細胞に感染させ、1 時間後に FBS を終濃度 10%になるよう加え、所定の時間 37°Cで培養した。

#### 2-6 レポーター法

L929 細胞を  $2.5 \times 10^5$  cells/well で 12 well plate にまき、DEAE-デキストラン法でトランスフェクションを行った。翌日、12 well plate から 48 well plate へ細胞を移し、さらにその翌日にウイルス感染および RNA トランスフェクションを 9 時間行い、1xPassive Lysis Buffer (Promega)加えて細胞を溶解し、細胞抽出液を回収した。プロモーター活性の測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)をマニュアルに従って使用した。

#### 2-7 Western Blotting および Native PAGE

細胞を NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1%NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM Vanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1mg/ml Leupeptin)で溶解し、-80°Cで 5 分置いた後 15000rpm、4°C、10 分間遠心した上清を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液は等量の 2xSDS sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4%sodium dodecyl sulfate (SDS), 20%グリセロール, 0.2 M dithiothreitol (DTT), 0.01% bromophenol blue (BPB))と混合し、100°Cで 5 分間加熱して変性させ、7.5%アクリルアミドゲルで 100V、

50 分間泳動した。その後セミドライ式のブロッティング装置を用い、polyvinylidene difluoride 膜に転写した(100 mA、60 分)。PVDF 膜はその後 5%スキムミルク(雪印乳業)/Tris-buffered saline (TBST)/ 0.05%Tween-20)溶液でブロッキング処理を行い、5%スキムミルク/TBST で 1000 倍希釈した所定の抗体溶液で 4℃で一晩処理した。翌日、TBST で 10 分間 3 回 PVDF 膜を洗浄し、5%スキムミルク/TBST で 3000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗マウス/ウサギ/ヤギ抗体(cell signaling technologies: CST)溶液で室温で 1 時間処理した。その後 TBST で 10 分間 3 回再び PVDF 膜を洗浄し、nitro-blue tetrazolium chloride- 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase p-Toluidine salt 染色キット(ナカライテスク)を用いて染色した。

Native PAGE では、7.5%アクリルアミドゲルを Native PAGE 泳動 Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.4)、192 mM グリシン、0.2%deoxycholic acid)で 25 mA、30 分間プレランした後、2xNative PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8)、30%グリセロール、0.01%BPB)と混合した細胞抽出液を加え、50 mM、50 分間泳動した。その後の操作は Western Blotting と同様の方法で行った。

## 2-8 免疫共沈法

HEK293T 細胞を  $5 \times 10^5$  cells/well で 6 well plate にまぎ、Lipofectamine 2000 を用いて合計 2  $\mu$ g のプラスミドをトランスフェクションした。24 時間培養後、細胞を回収し、Western Blotting と同様に NP-40 lysis buffer で細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液を 1  $\mu$ g の抗 Flag 抗体もしくは抗 c-myc 抗体と混合し氷上で 30 分間反応させた後、NP-40 lysis buffer で洗浄した Protein G sepharose (GE Healthcare) 10  $\mu$ l と混合し 4℃で一晩反応させた。翌日、NP-40 lysis buffer で 3 回洗浄した後、2xSDS sample buffer で溶出し、Western Blotting を行った。

## 2-9 定量的リアルタイム PCR (quantitative PCR: qPCR)

Sepasol (ナカライテスク)をマニュアルに従って使用し、細胞から total RNA を抽出した。抽出した total RNA は 5 U の DNase I (Roche)で 37℃で 30 分間処理してゲノム DNA の除去を行い、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)をマニュアルに従って使用し、cDNA を得た。Applied Biosystems 社の TaqMan Fast Advanced Master Mix と TaqMan probe をマニュアルに従って使用し、StepOne plus (Applied Biosystems)を用いて各 mRNA 量を測定した。18S リボソーム RNA を内在性コントロールとして各 mRNA を標準化して定量した。NDV RNA は、NDV

F 遺伝子を標的とした Forward; 5'-GCAGCTGCAGGGATTGTGGT-3'および Reverse; 5'-TCTTTGAGCAG GAGGATGTTG-3'のプライマーを用い、Fast SYBR green Master Mix (Applied Biosystems)を使用して定量を行った。

## 2-10 免疫染色法

細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液(ナカライテスク)で室温、10 分間固定した後、0.05% Triton X-100/phosphate-buffered saline (PBS)で室温、2 分間処理し、5%BSA (bovine serum albumin)/PBS/0.05%Tween-20 (PBST)で室温、30 分間ブロッキング処理を行った。その後、5%BSA/PBST で希釈した一次抗体を 4℃で一晩反応させた。翌日、PBST で室温、10 分間 3 回洗浄し、5%BSA/PBST で希釈した二次抗体を遮光、室温、1 時間反応させた。核は二次抗体反応後に 0.1 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; ナカライテスク)/PBST を室温、5 分間反応させて染色し、その後 PBST で室温、10 分間 3 回洗浄した。最後に封入剤とカバーガラス(松波硝子)を用いて封入し、共焦点顕微鏡(ライカマイクロシステムズ)で観察を行った。

## 2-11 組換え体タンパク精製

組換え体 LGP2 タンパクはバキュロウイルス発現系を用いて産生、精製を行った。pAcHLT (BD)に LGP2 cDNA を挿入したプラスミドと、BaculoGold DNA (BD)をマニユアルに従ってヨトウガ由来 Sf9 細胞にトランスフェクションし、26℃で 3 日間培養した上清をバキュロウイルス液として回収した。キンウワバ由来 High Five 細胞に、回収したバキュロウイルス液を加えて 26℃で 4 日間培養して感染させた。回収したバキュロウイルス感染細胞を Lysis buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.5 mM DTT、150 mM NaCl、1% n-dodecyl-β-D-maltoside、10 mM イミダゾル)で溶解し、15000 rpm、4℃、20 分間遠心した上清を、Ni-sepharose 6 fast flow (GE Healthcare)と混合し室温で 4 時間反応させた。その後、Elution buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.5 mM DTT、150 mM NaCl、500 mM イミダゾル)で溶出した。

組換え体 PUM1/2 タンパクは大腸菌を用いて産生、精製を行った。PUM1/2 全長および欠損変異体 cDNA を pGex-6p-1 (GE Healthcare)に挿入し、KOD plus mutagenesis kit (TOYOBO)を使用して 6xHis タグを付加した。作製したプラスミドを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、100 µg/ml アンピシリンを含む LB 培地で 37℃で振とう培養した。0.1 mM IPTG を加え 16℃で振とう培養することでタンパクの発現を誘導し、16 時間後に大腸菌を回収した。回収した大腸菌は Lysis buffer B (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、

500 mM NaCl、20 mM イミダゾル、Protease inhibitor cocktail (Roche))で懸濁し、超音波破砕機でタンパクを抽出した。抽出したタンパクを、Ni-sepharose 6 fast flow と混合し、室温で 4 時間反応させ、Elution buffer B (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、500 mM NaCl、500 mM イミダゾル)で溶出した。溶出したタンパクは PBS で希釈した後、Glutathione sepharose 4B (GE Healthcare)と混合し、4°Cで 16 時間反応させた。その後 Elution buffer C (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、20 mM Reduced glutathione)で溶出した。

#### 2-12 electrophoresis mobility shift assay (EMSA)

組換え体 LGP2 タンパク(0.5 µg)を <sup>32</sup>P で標識した dsRNA (25/25c)と、組換え体 PUM1/2 タンパク(0.5 µg)存在下、非存在下において、Reaction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1.5 mM DTT)中で 37°C、15 分間反応させた後、2xNative PAGE sample buffer と混合し、40 mA、50 分間プレランした 15%アクリルアミドゲルで 20 mA、50 分間泳動した。ゲルドライヤー(BioRad)を用い、80°C、30 分間乾燥させることでゲルをろ紙(Whatman)にトランスファーし、イメージングプレートに 1 時間露光させ、イメージングアナライザー(富士フィルム)で撮影した。

Scatchard-plot は、以前の報告と同様の方法で行った[63]。

#### 2-13 GST プルダウン法

組換え体 LGP2 タンパク(1.0 µg)と組換え体 PUM1/2 タンパク(1.0 µg)を、dsRNA (25/25c)存在下、非存在下において、Reaction buffer 中で 37°C、15 分間反応させた後、Glutathione sepharose 4B と混合し、室温で 1 時間反応させた。Reaction buffer で 3 回洗浄した後、2xSDS sample buffer で溶出し、Western blot を行った。

#### 2-14 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ウイルス感染や合成核酸等で刺激後 24 時間の培養上清を回収した。ヒト IFN-β ELISA キット(東レ)をマニュアルに従って使用し、培養上清中のヒト IFN-β量を測定した。

## 第三章

### 結果

### 第三章 結果

#### 3-1 過剰発現による PUM1 および PUM2 の I 型 IFN 誘導能の解析

まず IFN- $\beta$  レポーターアッセイにより、全長の PUM1 および PUM2 の I 型 IFN 誘導能の確認を行った。L929 細胞に IFN- $\beta$  レポータープラスミド(p-125Luc)および PUM1/2 発現プラスミドをトランスフェクションし、NDV 感染時の IFN- $\beta$  レポーター活性を測定した。その結果、PUM1/2 過剰発現によって IFN- $\beta$  レポーター活性の増加が確認された(図 3-1A)。IFN- $\beta$  遺伝子の転写は転写因子である IRF-3/7 および NF- $\kappa$ B によって制御されていることから、IRF および NF- $\kappa$ B レポータープラスミド(p-55C1BLuc および p-55A2Luc)を用いて同様の実験を行った。図 3-1B、C の通り、Pumilio 過剰発現は p-55C1BLuc および p-55A2Luc の活性を増加させたことから、Pumilio は IRF および NF- $\kappa$ B 両方のシグナルに関与していることが明らかとなった。

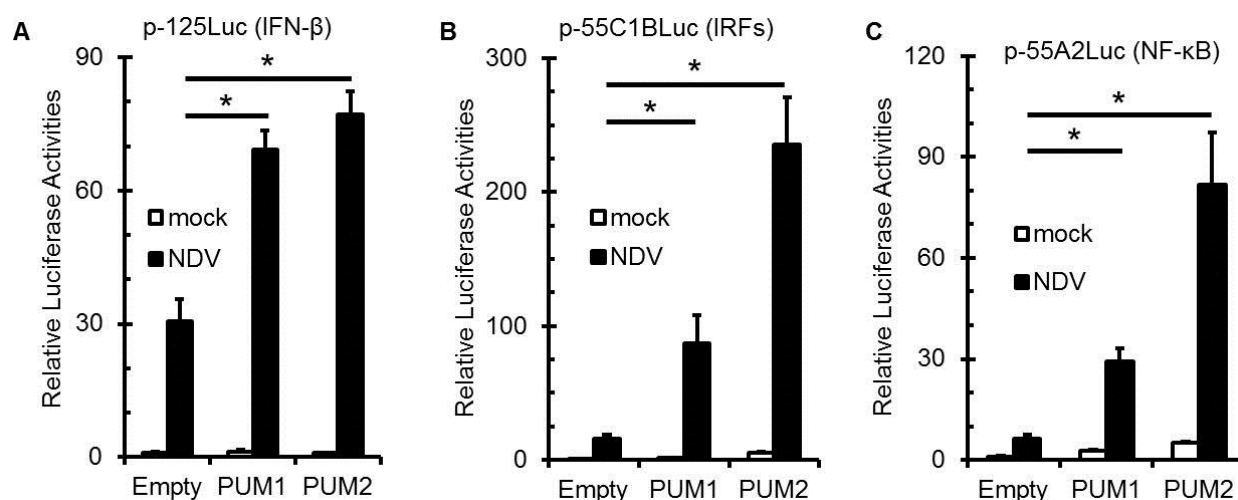


図 3-1 NDV 感染時の IFN- $\beta$  プロモーター活性の測定

(A-C) L929 細胞に p-125Luc (A)、p-55C1BLuc (B) または p-55A2Luc (C) を空ベクター、PUM1 または PUM2 発現プラスミドと共にトランスフェクションし、mock 処理もしくは NDV 9 時間感染後の各レポーター活性を測定した。\*;  $p < 0.05$

次に、Pumilio 過剰発現が NDV 増殖に及ぼす影響を確認した。L929 細胞に PUM1/2 発現プラスミドをトランスフェクションし、NDV 感染 24 時間後の細胞内 NDV RNA 量を qPCR 法で測定した。その結果、IFN- $\beta$  レポーター活性が増加していることと一致して、NDV 感染後 24 時間における NDV RNA 量は Pumilio 過剰発現によって減少していることが明らかとなった(図 3-2)。

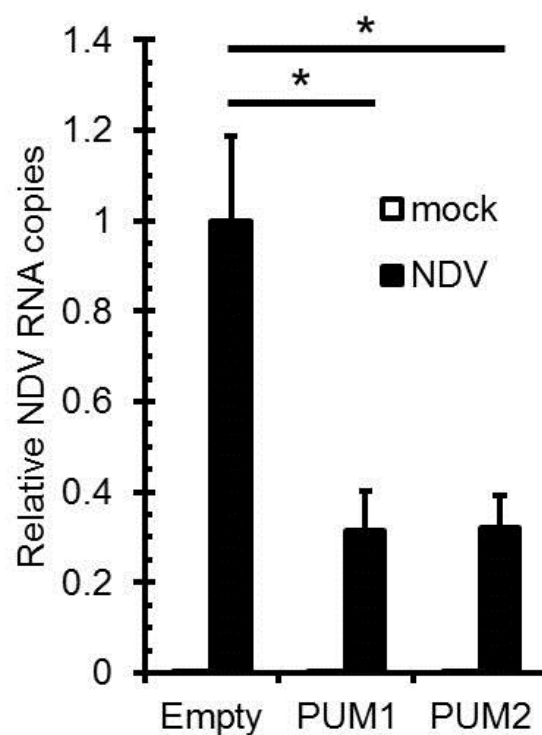


図 3-2 Pumilio 過剰発現時の NDV RNA 量の測定

L929 細胞に空ベクター、PUM1 もしくは PUM2 発現プラスミドをトランスフェクションし、mock 処理もしくは NDV 24 時間感染後の NDV RNA 量を qPCR で測定した。\*;  $p < 0.05$



### 3-2 Pumilio 点変異体の I 型 IFN 誘導能の解析

これまでの報告により、Pumilio は NRE (nanos-response element) と呼ばれる配列に結合し、その翻訳を抑制することが知られている[64]。また、PUM2 においては NRE への結合には 850 番目のヒスチジン(H850)が重要であることが明らかとなっており、このヒスチジンをアラニンに置換した変異体(PUM2H850A)は、NRE へ結合せず、翻訳を抑制しないことが報告されている[65]。このアミノ酸(PUM2H850)は PUM1 でも保存されている(PUM1H972)ことから、これら Pumilio 点変異体(PUM1H972A、PUM2H850A)発現プラスミドを作製し、Pumilio の翻訳抑制と I 型 IFN 誘導能との関係性を検討した。L929 細胞に Pumilio 野生型および点変異体発現プラスミドを IFN- $\beta$  レポータープラスミドとともにトランスフェクションし、NDV 感染後の IFN- $\beta$  レポーター活性を測定した。その結果、Pumilio 点変異体は野生型と同程度 IFN- $\beta$  レポーター活性を増加させたことが明らかとなった(図 3-3)。このことから、Pumilio の I 型 IFN 誘導能は、NRE への結合および翻訳抑制とは独立した機能であることが示唆された。

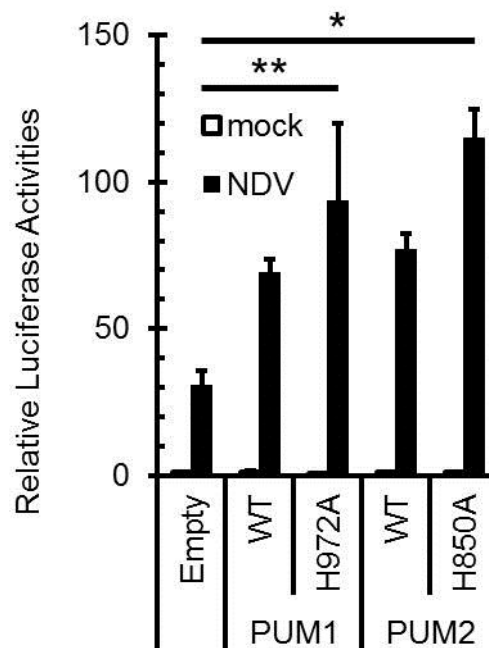


図 3-3 Pumilio 点変異体の IFN- $\beta$  プロモーター活性の解析

L929 細胞に空ベクター、PUM1/2 野生型もしくは点変異体発現プラスミドを p-125Luc と共にトランスフェクションし、NDV 9 時間感染後のレポーター活性を測定した。\*;  $p < 0.05$ 、\*\*;  $p < 0.1$

### 3-3 siRNA を用いた Pumilio 遺伝子発現抑制による機能解析

続いて、Pumilio の I 型 IFN 発現誘導における機能を詳細に解析するため、siRNA を用いて Pumilio 遺伝子の発現抑制を行った。異なった配列を標的とするそれぞれ 2 種類の siRNA を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の Pumilio タンパク発現量をウエスタンブロットで確認したところ、それぞれの siRNA は標的とする遺伝子の発現を特異的に抑制していることが示された(図 3-4)。

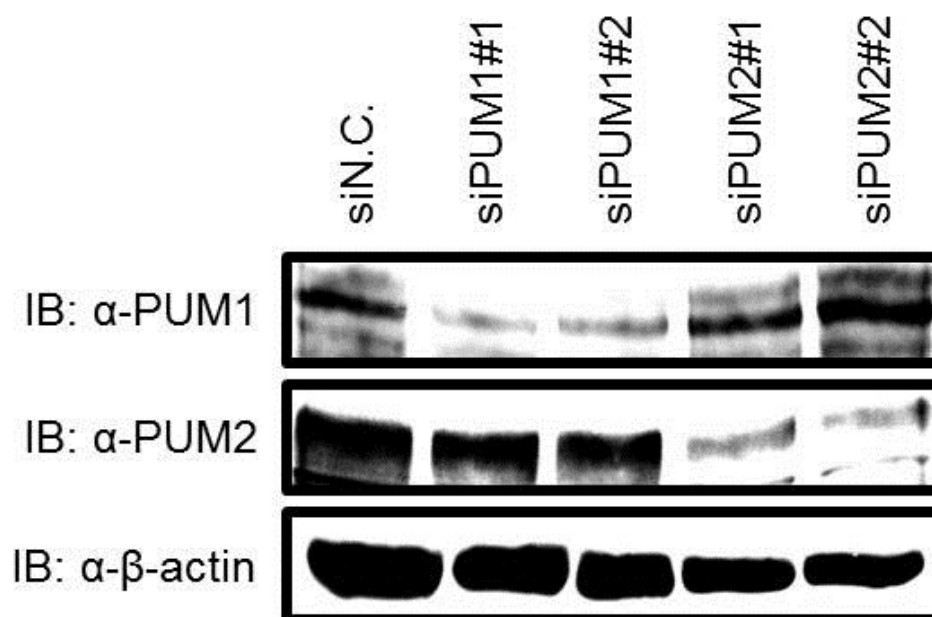


図 3-4 siRNA を用いた Pumilio 遺伝子発現抑制

HEK293T 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、48 時間培養後の各タンパク質の発現を western blot で確認した。

そこで、Pumilio をノックダウンした細胞に NDV を感染させ、qPCR 法で I 型 IFN 発現誘導の解析を行った。その結果、Pumilio ノックダウンにより、NDV 感染に応答した *IFNB1* mRNA および ISG の一つである *CXCL10* mRNA の発現が減弱していることが明らかとなった(図 3-5A、B)。

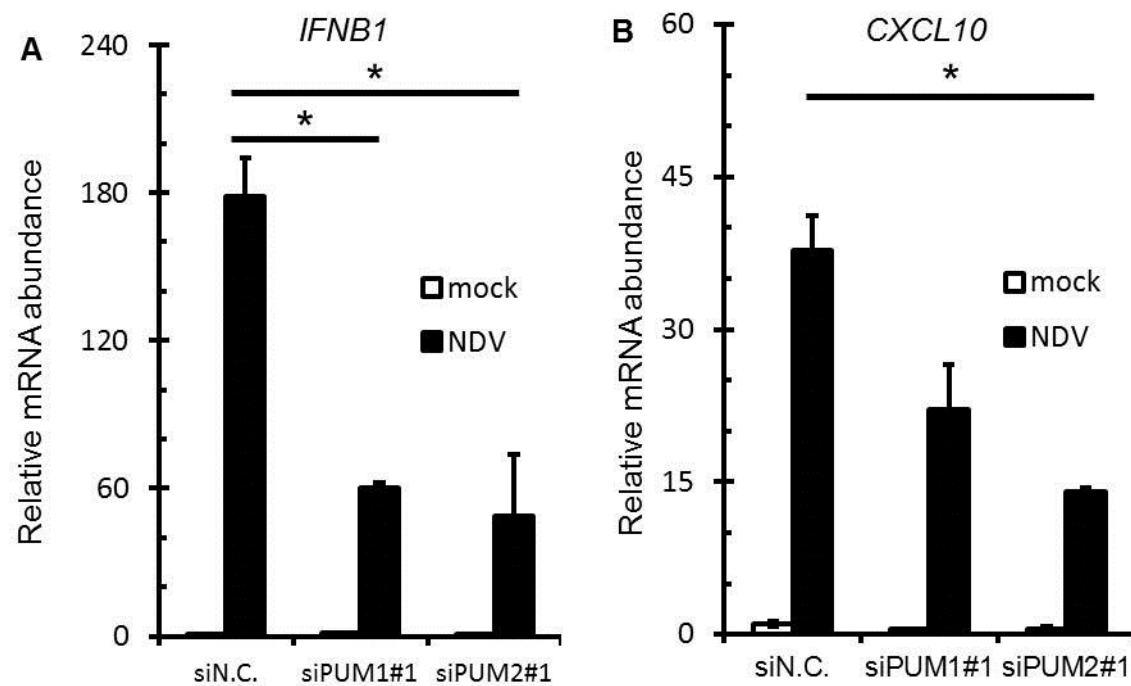


図 3-5 NDV 感染時の *IFNB1*、*CXCL10* mRNA 発現量の解析

(A, B) HEK293T 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、NDV 9 時間感染後の *IFNB1* (A)、*CXCL10* (B) mRNA 量を qPCR で測定した。\*; p<0.05

また、I 型 IFN の転写因子である IRF-3 は、活性化されると特定のセリン残基がリン酸化され、二量体を形成することが明らかとなっていることから[62]、Pumilio をノックダウンした細胞における NDV 感染による IRF-3 の二量体形成とリン酸化状態を Native PAGE 法で調べた。その結果、NDV 感染で誘導される IRF-3 の二量体形成およびリン酸化は、Pumilio ノックダウンによって減弱していることが明らかとなった(図 3-6)。

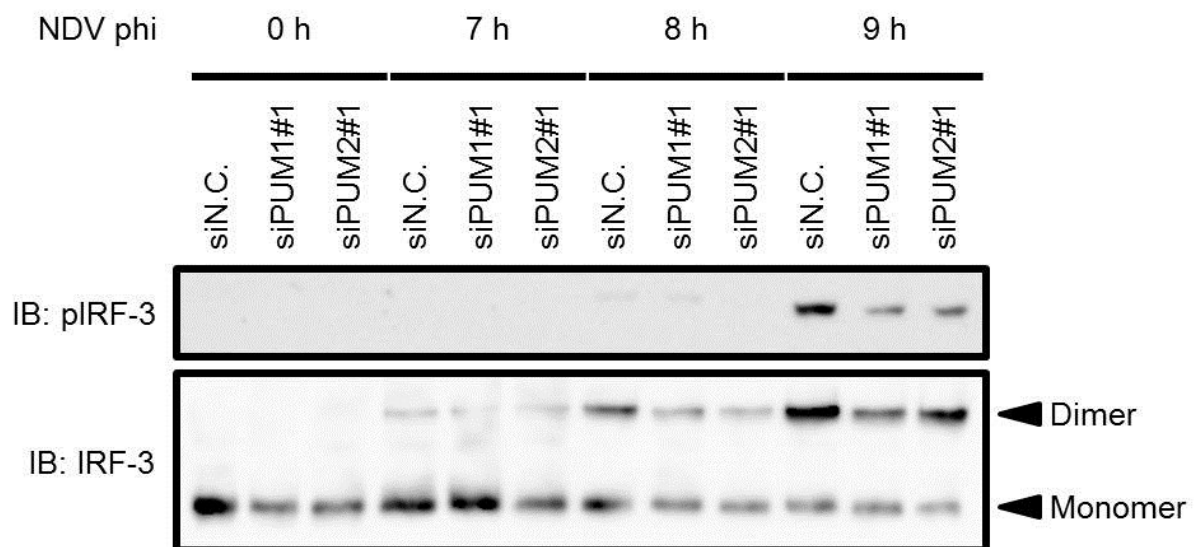


図 3-6 NDV 感染時の IRF-3 リン酸化および二量体形成

HEK293T 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、NDV 感染 0、7、8、9 時間後の IRF-3 のリン酸化状態および二量体形成を Native PAGE で確認した。

さらに、NDV 感染時の培養上清中の IFN- $\beta$ タンパク発現量を ELISA 法により測定した。NDV 感染 24 時間後における培養上清中の IFN- $\beta$ 発現量は、Pumilio ノックダウン細胞ではコントロール細胞より減少していた(図 3-7A)。また、この時細胞内 NDV RNA 量を定量的リアルタイム PCR 法で測定したところ、I 型 IFN 発現が減弱していたことと一致して、Pumilio ノックダウンにより NDV RNA 量は増加していることが明らかとなった(図 3-7B)。

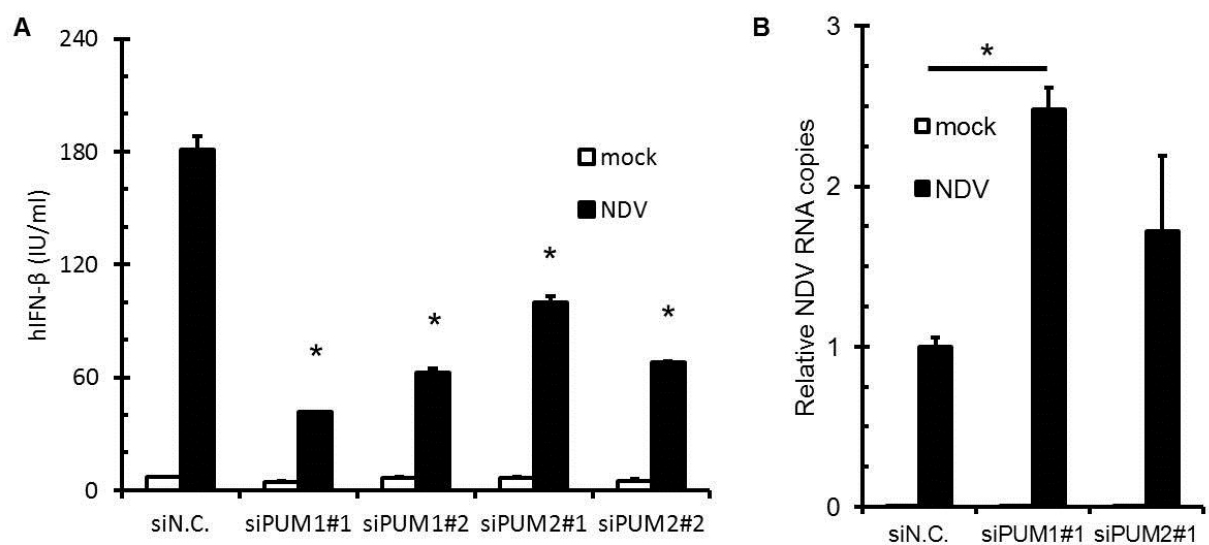


図 3-7 NDV 感染時の IFB- $\beta$ タンパク量と NDV RNA 量の解析

(A, B) HEK293T 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、NDV 24 時間感染後の培養上清中の IFN- $\beta$  タンパク量(A)を ELISA 法で、NDV RNA 量(B)を q PCR で測定した。\*;  $p < 0.05$

次に、Pumilio ノックダウン細胞における RLR 発現量をウエスタンブロッティングで解析を行った。その結果、RLR 発現量は Pumilio ノックダウンによって変化しないことが明らかとなった(図 3-8)。

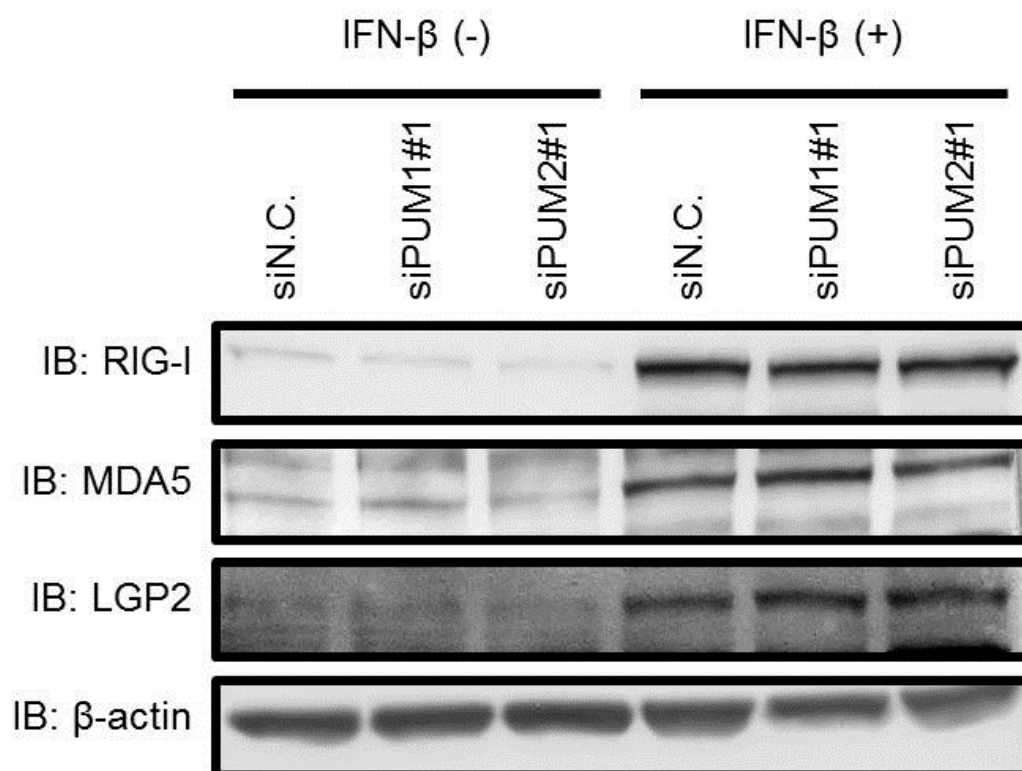


図 3-8 Pumilio 遺伝子発現抑制時の RLR 発現量の解析

HEK293T 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、ヒト IFN-β ( $1 \times 10^3$  U/ml) で 24 時間処理した後、RLR 発現量を Western blot で確認した。

最後に、他のウイルス感染および合成核酸刺激時の IFN- $\beta$ 発現量を ELISA 法で測定した。ここでは、Paramyxoviridae のセンドライウイルス(SeV)および NDV、Rhabdoviridae の水疱性口内炎ウイルス(VSV)、合成長鎖 RNA である poly I:C、in vitro 転写により合成した 5'pppRNA および合成 DNA である poly dA:dT を使用した。その結果、これまでの結果と同様に、NDV 感染時の IFN- $\beta$ 産生は Pumilio ノックダウンで減弱していたが、SeV および VSV 感染時の培養上清中の IFN- $\beta$ 量は、PUM1 ノックダウンでは顕著に減少していたが、PUM2 ノックダウンではコントロールと差が見られなかった(図 3-9A)。また、Pumilio ノックダウンによる合成核酸刺激時の IFN- $\beta$ 発現量にも変化が見られなかった(図 3-9B)。

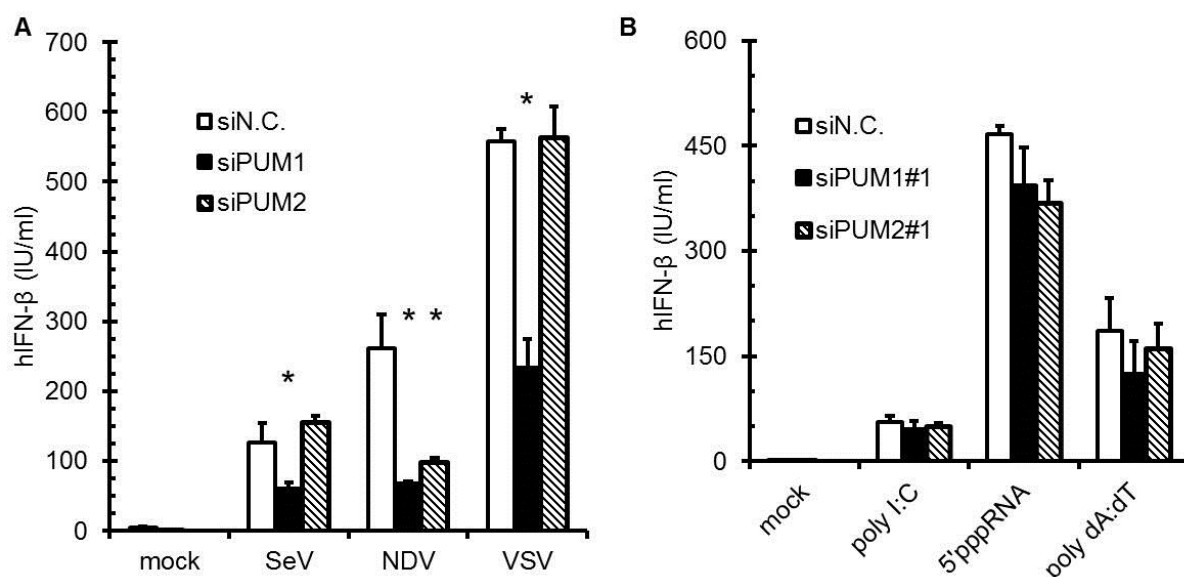


図 3-9 種々の刺激による IFN- $\beta$ 産生量の解析

(A, B) HEK293T 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、SeV、NDV、VSV 24 時間感染後(A)、もしくは poly I:C、5'pppRNA、poly dA:dT 24 時間トランスフェクション後(B)の培養上清中の IFN- $\beta$  産生量を ELISA 法で測定した。\*;  $p < 0.05$

### 3-4 Pumilio と RLR および RLR シグナル分子との相互作用の解析

NDV 感染は RLR の一つである RIG-I によって主に認識されることが、ノックアウトマウスを用いた解析により明らかとなっている[12,13]。そこで、Pumilio タンパクがどのようにして NDV 感染時の I 型 IFN 産生誘導を制御しているのかを明らかにするため、Pumilio と RLR および RLR シグナル分子である IPS-1 と TRIM25 との相互作用を免疫共沈法にて解析を行った。HA タグ付加 RIG-I、MDA5、LGP2 および IPS-1 と、Flag タグ付加 PUM1 および PUM2 を HEK293T 細胞に過剰発現させ、その細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降したところ、Pumilio は LGP2 のみを共沈した(図 3-10)。また、Myc タグ付加 TRIM25 と、Flag タグ付加 PUM1 および PUM2 を同様に過剰発現させ、抗 Myc 抗体で免疫沈降したところ、Pumilio の共沈は確認できなかった(図 3-10)。これらの結果から、Pumilio は LGP2 と特異的に結合していることが明らかとなった。

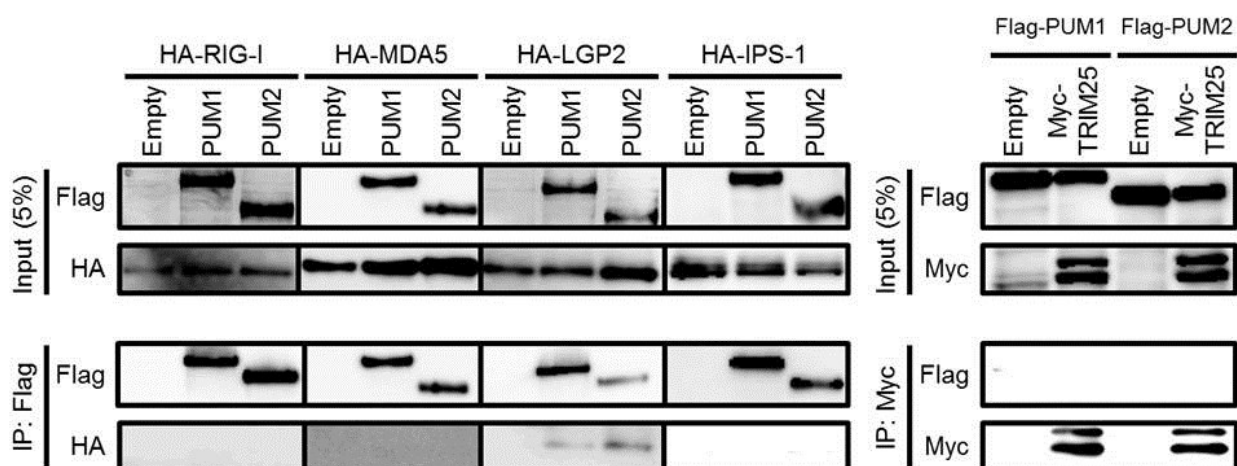


図 3-10 Pumilio と RLR シグナル関連因子との相互作用の解析

HEK293T 細胞に HA タグ付加 RIG-I、MDA5、LGP2 もしくは IPS-1 発現プラスミドを空ベクター、Flag タグ付加 PUM1 もしくは PUM2 発現プラスミドと共にトランスフェクションした。TRIM25 の場合は Flag タグ付加 PUM1 もしくは PUM2 発現プラスミドを、空ベクターもしくは Myc タグ付加 TRIM25 発現プラスミドと共にトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間の細胞抽出液を回収し、抗 Flag 抗体もしくは抗 Myc 抗体で免疫沈降し、溶出物を Western blot で確認した。



次に、Pumilio と LGP2 との相互作用に、それぞれの分子のどの領域が重要であるかを明らかにするため、欠損変異体を用いた免疫沈降法によって解析を行った。Pumilio の PUM-HD を欠失した変異体(dC)および PUM-HD のみの変異体(dN)を作製し(図 3-11A)、その相互作用を解析したところ、LGP2 は Pumilio dN では共沈されず、全長および dC で共沈されたことから(図 3-11B)、LGP2 との相互作用には Pumilio の N 末端側の領域が重要であることが示された。また、PUM-HD が LGP2 と相互作用に関与しないことと一致して、NRE への結合能を欠失した Pumilio 点変異体(PUM1H972A、PUM2H850A)も LGP2 との相互作用していることが明らかとなった(図 3-11B)。一方、LGP2 の CTD を欠失した変異体(dCTD)および CTD のみの変異体(CTD)を作製し、Pumilio との免疫共沈を行ったところ、LGP2 CTD は Pumilio で共沈されず、全長および dCTD で共沈された(図 3-11C)。これらの結果から、Pumilio と LGP2 は、Pumilio の N 末端側の領域と LGP2 のヘリカーゼドメインとで相互作用を行っていることが示された。

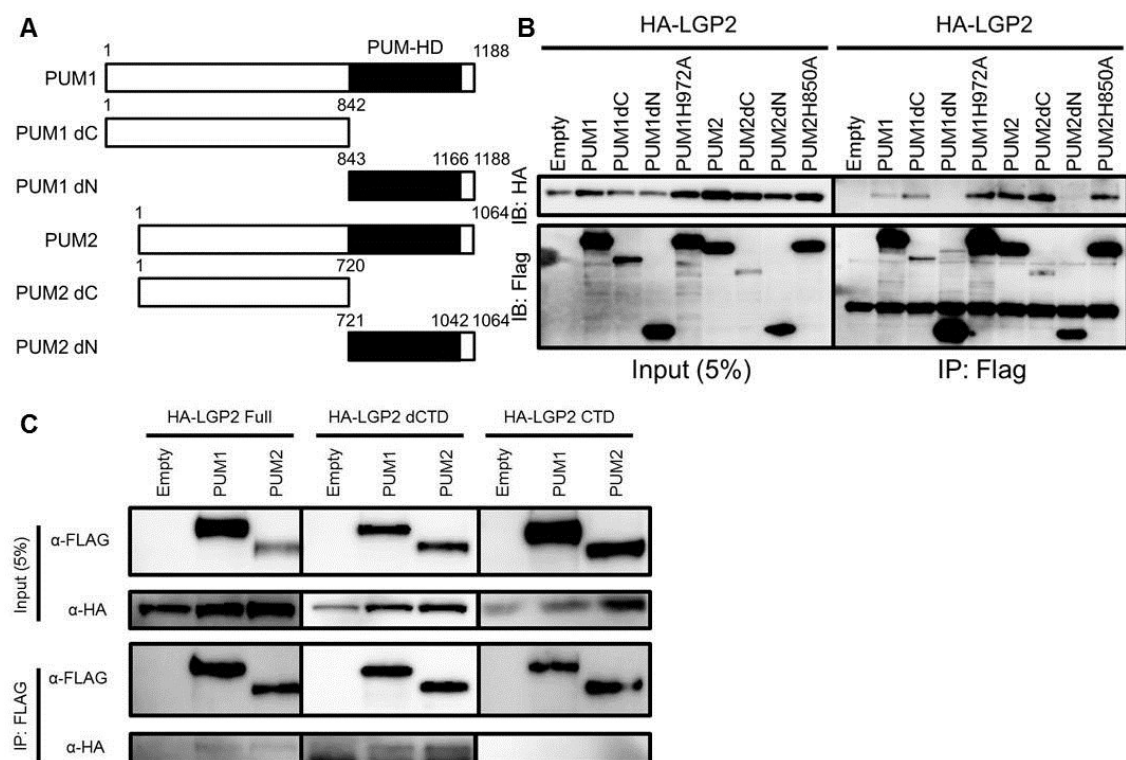


図 3-11 Pumilio 欠損変異体の一次構造および LGP2 との相互作用の解析

(A) Pumilio 欠損変異体の一次構造。(B) HEK293T 細胞に HA タグ付加 LGP2 発現プラスミドと Flag タグ付加 PUM1/2 野生型、欠損変異体もしくは点変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後の細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降した。(C) HEK293T 細胞に HA タグ付加 LGP2 野生型もしくは欠損変異体発現プラスミドと PUM1 もしくは PUM2 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後の細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降した。

さらに、Pumilio 同士が相互作用しているか同様に免疫共沈法によって解析した。その結果、PUM2 は PUM1 によって共沈したことから、Pumilio 同士でも相互作用していることが明らかとなった(図 3-12)。

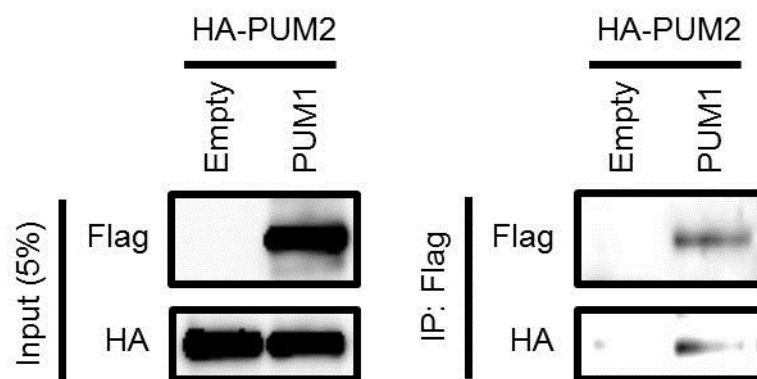


図 3-12 PUM1 と PUM2 との相互作用の解析

HEK293T 細胞に HA タグ付加 PUM2 と Flag タグ付加 PUM1 発現プラスミドをトランスフェクションし、24 時間後の細胞抽出液を抗 Flag 抗体で免疫沈降した。

### 3-5 Pumilio 欠損変異体による I 型 IFN 誘導能の解析

これまでの結果から、Pumilio は N 末端側の領域で LGP2 と相互作用していることが明らかとなったが、過去の報告により、C 末端の PUM-HD は RNA 結合領域であることが明らかとなっている[66]。そこで、相互作用の解析に用いた Pumilio 欠損変異体を用いて IFN- $\beta$  レポーターアッセイを行い、これらの I 型 IFN 誘導能の解析を行った。これまでの結果と同様に、野生型 Pumilio 過剰発現は NDV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  レポーター活性を増大させたが、Pumilio dC および dN を過剰発現させても、IFN- $\beta$  レポーター活性に変化は見られなかった(図 3-13)。このことから、Pumilio の N 末端側と C 末端側両方の領域が I 型 IFN の産生誘導に必要であることが明らかとなった。

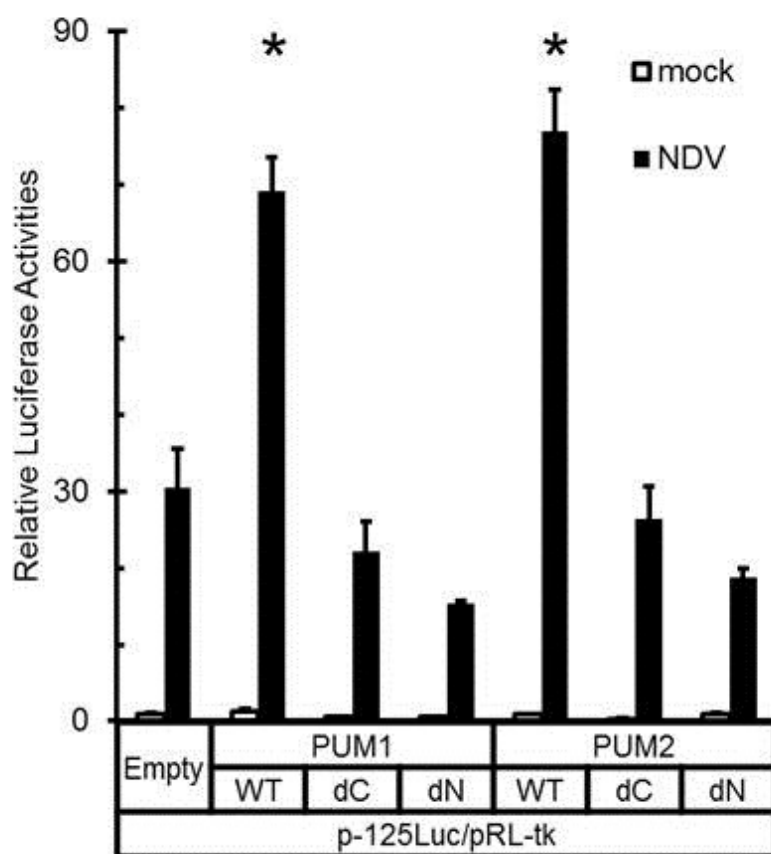


図 3-13 Pumilio 欠損変異体の NDV 感染時における IFN- $\beta$  プロモーター活性の解析  
L929 細胞に Pumilio 野生型もしくは欠損変異体発現プラスミドを p-125Luc と共にトランスフェクションし、NDV 9 時間感染後の IFN- $\beta$  プロモーター活性を測定した。

### 3-6 LGP2 遺伝子発現抑制の Pumilio による I 型 IFN 発現誘導能の解析

免疫共沈法により、Pumilio は LGP2 と特異的に相互作用していることが明らかとなったが、これまでの報告により、LGP2 は NDV 感染による I 型 IFN 発現誘導における正の調節因子であることが示されている[14]。そこで、LGP2 の Pumilio による I 型 IFN 発現誘導に及ぼす影響を明らかにするため、shRNA (short-hairpin RNA)を用いた LGP2 遺伝子発現抑制を行い、Pumilio 過剰発現による I 型 IFN 発現誘導能を解析した。その結果、Pumilio 過剰発現による IFN- $\beta$ レポーター活性の増加は、LGP2 ノックダウンにより減弱することが明らかとなり、LGP2 は Pumilio による I 型 IFN 発現誘導に重要な分子であることが示された(図 3-14)。

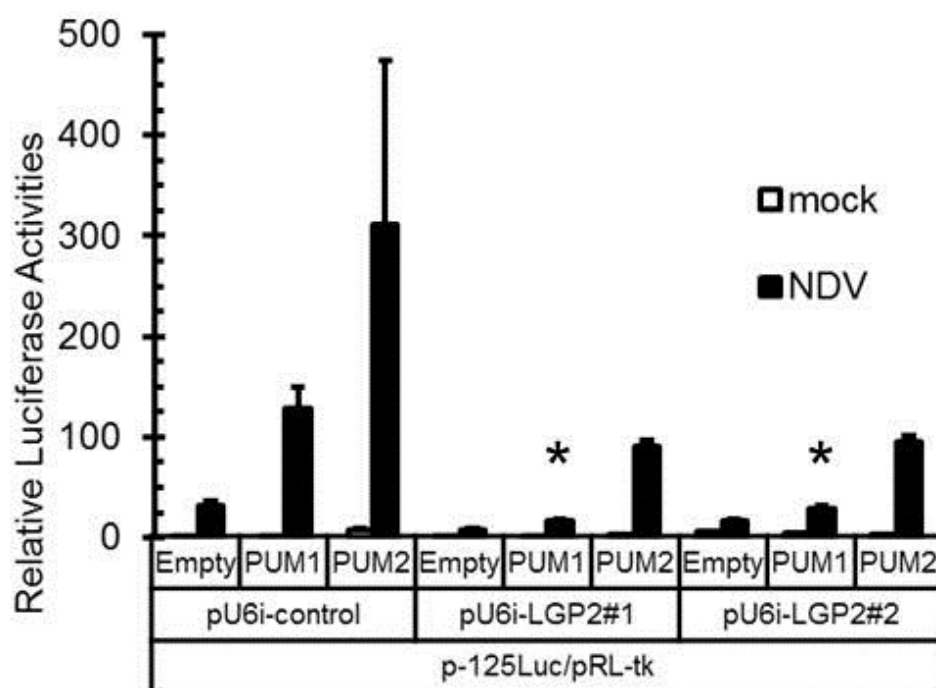


図 3-14 LGP2 発現抑制時の NDV 感染における IFN- $\beta$ プロモーター活性の解析  
L929 細胞に p-125Luc と shRNA 発現プラスミドを、PUM1 もしくは PUM2 発現プラスミドと共にトランスフェクションし、NDV 9 時間感染後のプロモーター活性を測定した。

\*;  $p < 0.05$

### 3-7 Pumilio の細胞内局在の解析

これまでの報告により、Pumilio は酸化ストレス刺激などによりストレス顆粒(SG)に局在することが明らかとなっている[67,68]。また、ウイルス感染時にも SG 様の凝集体形成は誘導され、RLRs や PKR、DHX36、RNaseL などの抗ウイルス分子もこの SG 様凝集体(抗ウイルスストレス顆粒(avSGs))に集積する[54,55]。このことから、avSGs はウイルス感染の認識の場となっている可能性が示唆されている。そこで、ウイルス感染時の Pumilio の細胞内局在を免疫染色法で確認した。ウイルス非感染時には細胞質に均一に分布している Pumilio は、NDV 感染によって細胞質で凝集体を形成し共局在した(図 3-15A)。SG のマーカーである抗 TIAR 抗体を用いて染色を行ったところ、NDV 感染時に PUM1 は TIAR と共局在したことから、Pumilio は avSGs に局在していることが明らかとなった(図 3-15B)。さらに、抗 LGP2 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、Pumilio は avSGs で LGP2 と共局在していた(図 3-15C)。

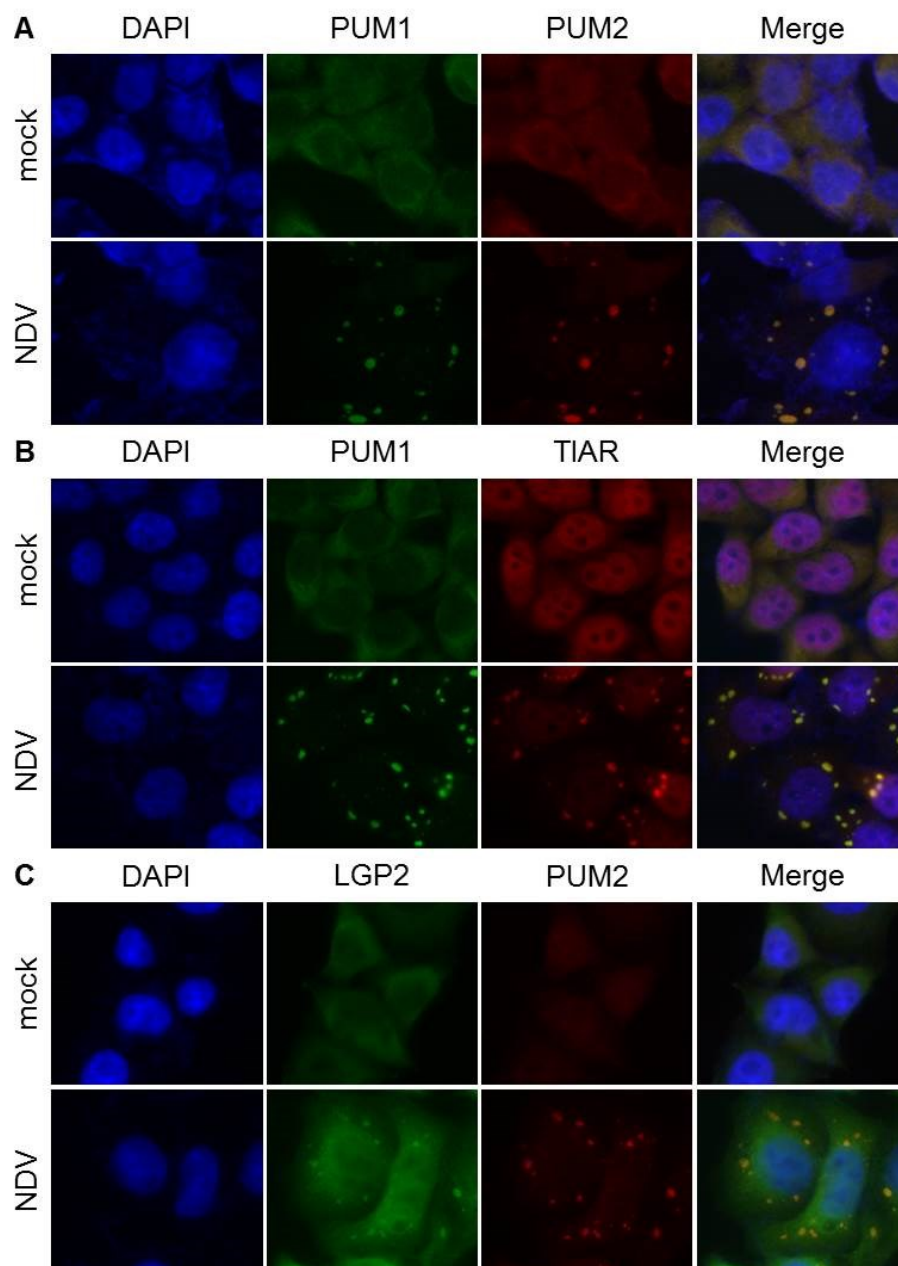


図 3-15 Pumilio の細胞内局在の解析

(A-C) HeLa 細胞に NDV を 9 時間感染させた後、抗 PUM1 抗体および抗 PUM2 抗体(A)、抗 PUM1 抗体および抗 TIAR 抗体(B)、抗 LGP2 抗体および抗 PUM2 抗体(C)で染色した。核は DAPI で染色した。

次に、avSG 形成における Pumilio の役割を明らかにするため、Pumilio ノックダウン細胞での avSG 形成を調べた。その結果、コントロール細胞と同様に、Pumilio をノックダウンした細胞においても avSG の形成が確認されたことから、Pumilio は avSG 形成には関与していないことが明らかとなった(図 3-16A)。また、Pumilio ノックダウン細胞においても LGP2 は avSG へ局在したことから、Pumilio は LGP2 の細胞内局在の制御にも関与していないことが示された(図 3-16B)。さらに、LGP2 欠損細胞における Pumilio の細胞内局在を調べたところ、野生型細胞と同様に NDV 感染に応答した avSG への局在が確認できたことから、LGP2 もまた Pumilio の細胞内局在の制御に関与していないことが明らかとなった(図 3-16C)。



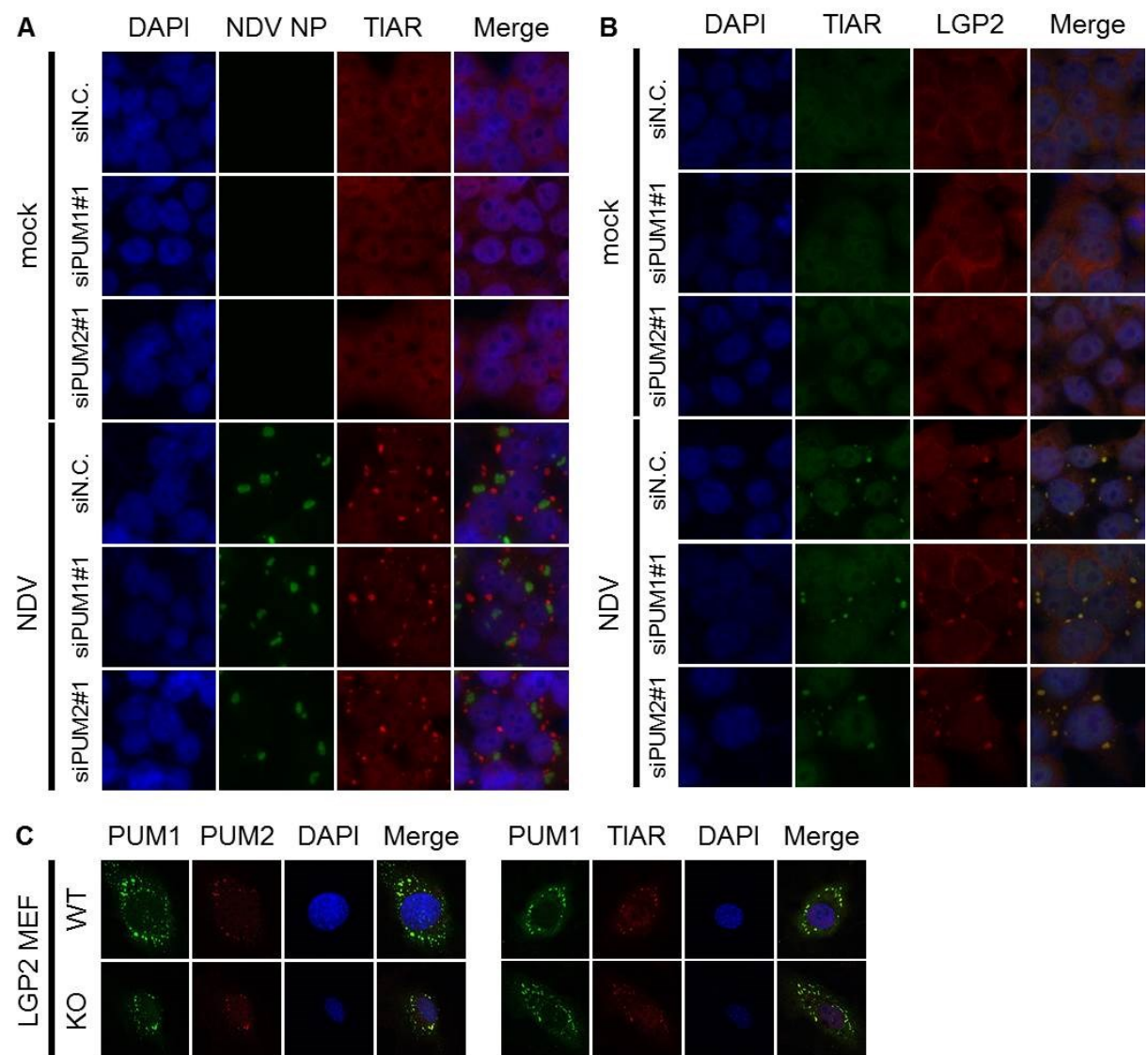


図 3-16 Pumilio および LGP2 の avSG 形成における機能解析

(A, B) HeLa 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、NDV 9 時間感染後に指定の抗体で染色した。(C) 野生型 MEF および LGP2 欠損細胞に NDV を 9 時間感染させ、指定の抗体で染色した。核は DAPI で染色した。

### 3-8 Pumilio 存在下における LGP2 RNA 結合能の解析

これまでの結果から、Pumilio は LGP2 と結合し、LGP2 を介して I 型 IFN 産生誘導に関与していることが明らかとなった。そこで、その詳細な分子機構を明らかにするため、Pumilio 存在下、非存在下における LGP2 の RNA 結合能の解析を行った。これまでの報告から、LGP2 は RIG-I や MDA5 よりも強い RNA 結合能を示し、ゲルシフト法によって RNA との結合が確認されている[15,31]。まず、ゲルシフト法によって確認されている RNA との結合が、LGP2 と RNA との結合であることを示すため、抗体を用いゲルシフト法を行った。図 3-17 から、コントロールのマウス IgG 存在下では、ゲル上部にシフトしたバンドの位置に変化は確認できない。一方、組換え体 LGP2 は Flag タグが付加されていることから、抗 Flag 抗体を用いたところ、バンドはさらに上部にシフトした。この結果から、LGP2 は RNA と結合し、ゲルシフト法においてはゲル上部で複合体が検出されることが明らかとなった。

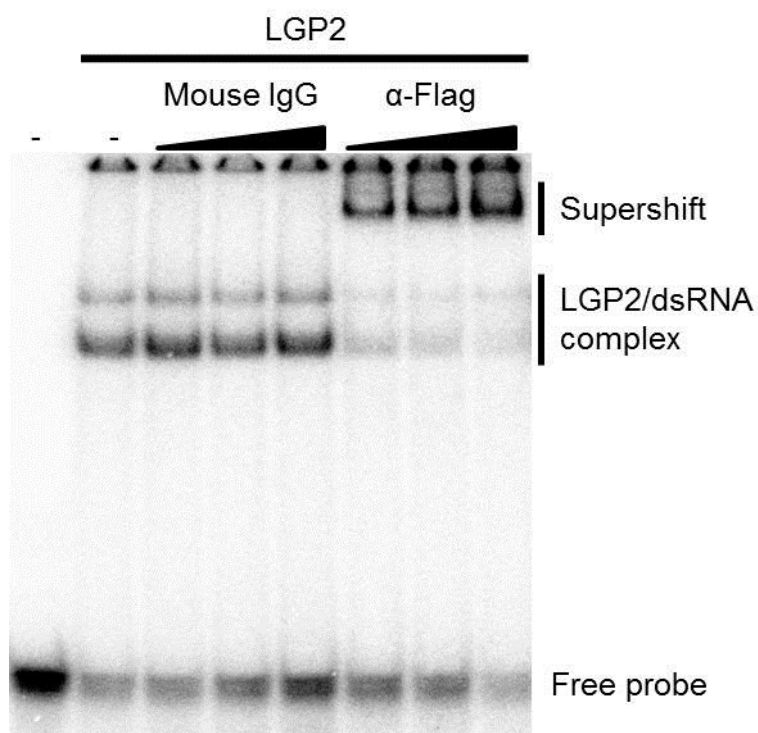


図 3-17 ゲルシフト法による LGP2 の dsRNA 結合能の解析

組換え体 LGP2 (0.5  $\mu$ g) を  $^{32}$ P 標識した dsRNA とマウス IgG もしくは抗 Flag 抗体と混合し、15%アクリルアミドゲルで泳動した。

次に、Pumilio 存在下および非存在下で LGP2 の RNA 結合能の解析を行った。図 3-18 から、LGP2 と RNA との複合体を示すバンドの強度は、Pumilio 存在下で増加していることが明らかとなった。一方、Pumilio 単独では、RNA との結合は非常に弱く、シフトしたバンドはほとんど確認できなかったことから、この結果は、Pumilio が LGP2 の RNA 結合能を増大させていることを示している。

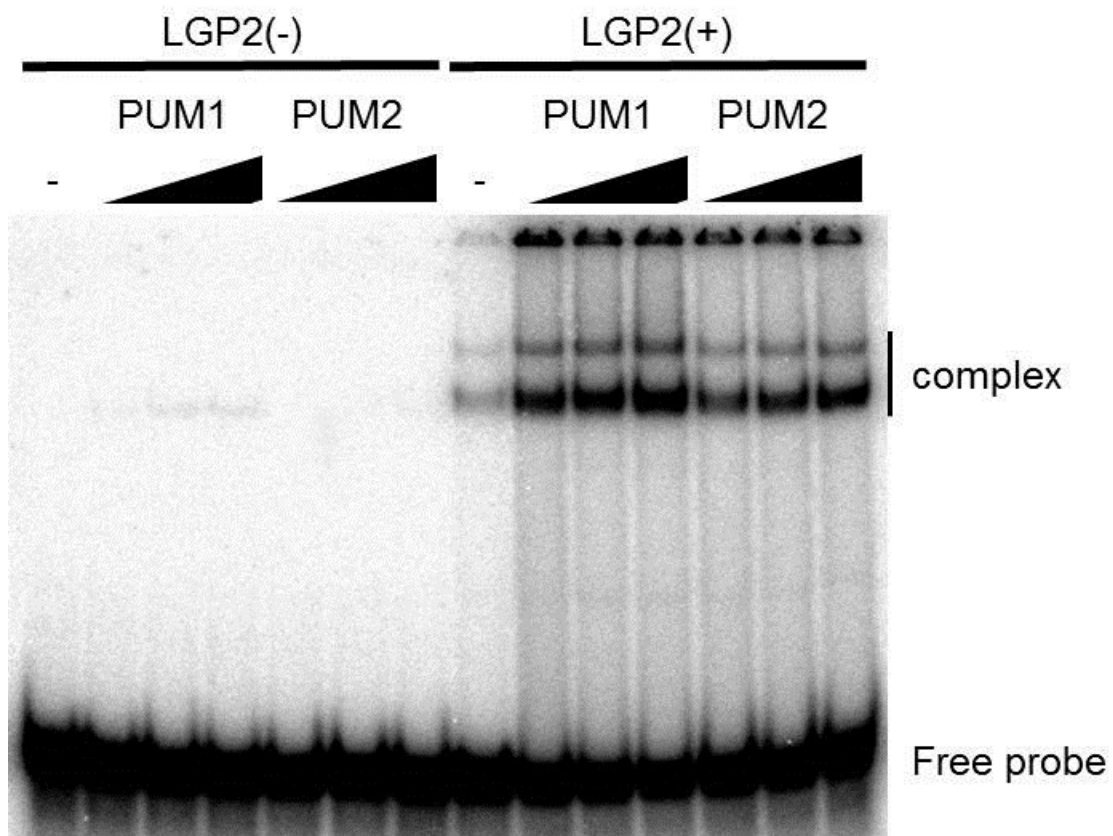


図 3-18 Pumilio 存在下、非存在下における LGP2 と dsRNA の結合能の解析  
組換え体 PUM1 もしくは PUM2 (0.5  $\mu$ g) と  $^{32}$ P 標識した dsRNA を LGP2 (0.5  $\mu$ g) 存在下および非存在下で混合し、15%アクリルアミドゲルで泳動した。

続いて、Scatchard-plot 法により、LGP2 と RNA との結合の解離定数( $K_d$ )を測定した。その結果、コントロールのウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)存在下では  $K_d=0.478 \text{ nM}^{-1}$  であったのに対し、PUM1 および PUM2 存在下ではそれぞれ  $K_d=0.181$  および  $0.113 \text{ nM}^{-1}$  となり、Pumilio が LGP2 と RNA との結合を増強していることが示された(図 3-19)。

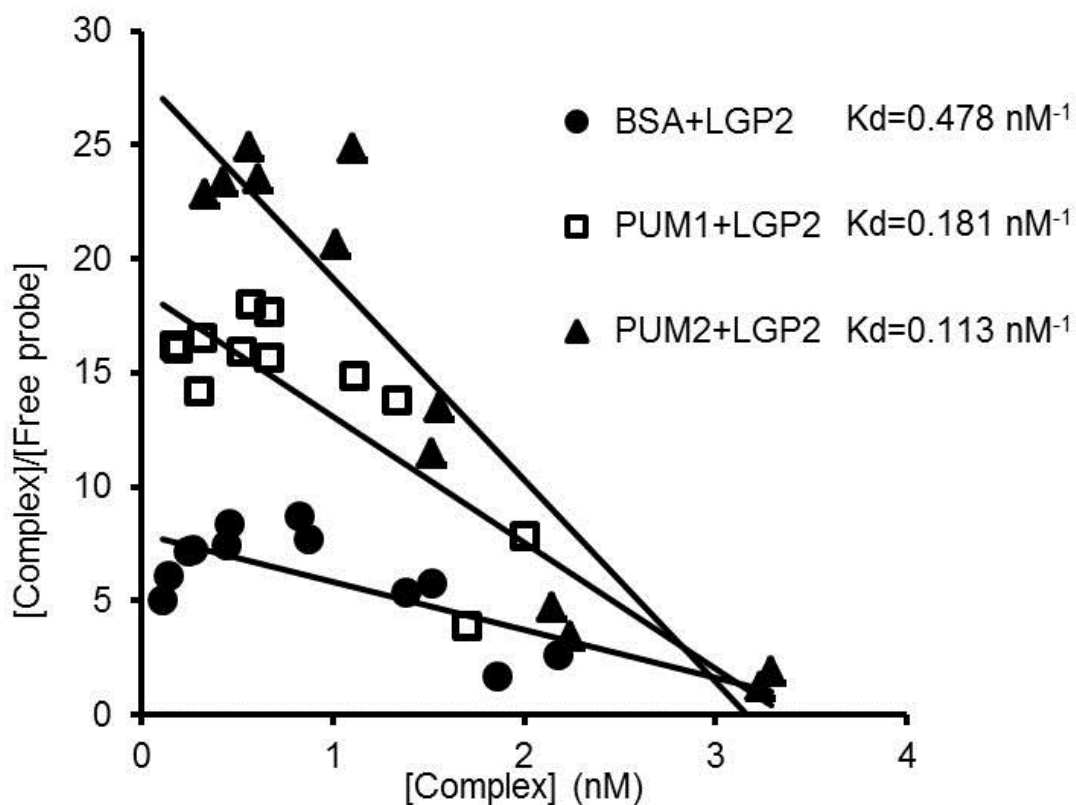


図 3-19 Pumilio 存在下、非存在下における LGP2 と dsRNA の Scatchard-plot  
組換え体 LGP2 (0.25  $\mu\text{g}$ ) と BSA、PUM1 もしくは PUM2 (0.5  $\mu\text{g}$ ) を  $^{32}\text{P}$  標識した dsRNA (0.625-20 fmol) と混合し、15%アクリルアミドゲルで泳動した。

また、LGP2 と Pumilio との結合は Pumilio の N 末端領域が重要であったことから(図 3-11B)、Pumilio dC 存在下での LGP2 と RNA との結合も同様にゲルシフト法にて解析を行った。その結果、全長の Pumilio を用いた時と同様に、Pumilio dC 存在下でも LGP2 と RNA との結合は強くなっていることが明らかになった(図 3-20A)。さらに、Pumilio dC 存在下での LGP2 と RNA との解離定数を測定したところ、コントロールの BSA 存在下では  $K_d=0.191 \text{ nM}^{-1}$  であったのに対し、PUM1dC および PUM2dC 存在下ではそれぞれ  $K_d=0.150$  および  $0.103 \text{ nM}^{-1}$  となり、LGP2 と RNA との結合を増強させるのに Pumilio N 末端領域が重要であることが明らかとなった(図 3-20B)。

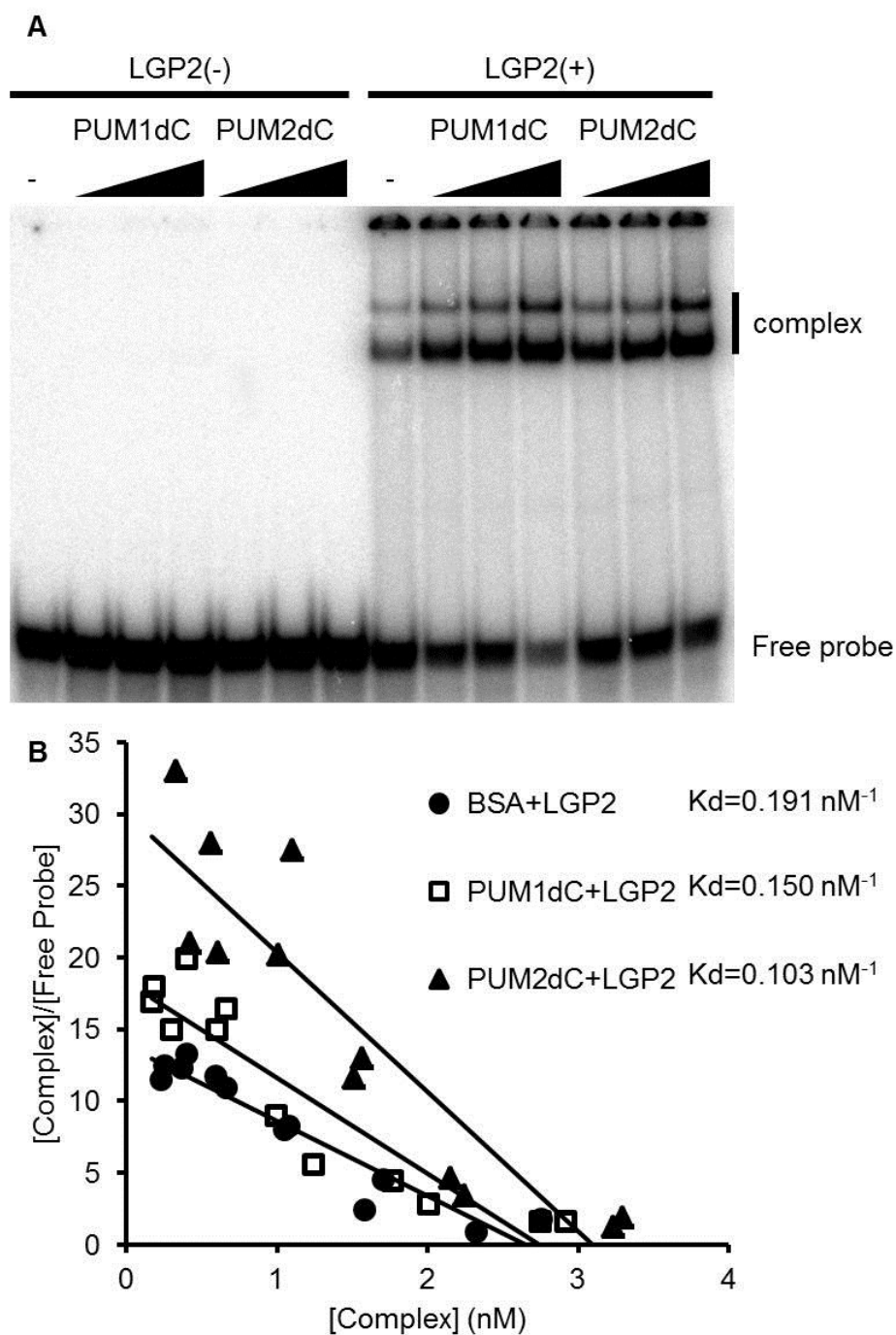


図 3-20 Pumilio dC 存在下、非存在下における LGP2 と dsRNA の結合能の解析  
 (A)組換え体 PUM1dC もしくは PUM2dC (0.5  $\mu\text{g}$ )と  $^{32}\text{P}$  ラベルした dsRNA を LGP2 (0.5  $\mu\text{g}$ )  
 存在下および非存在下で混合し、15%アクリルアミドゲルで泳動した。(B) 組換え体 LGP2  
 (0.25  $\mu\text{g}$ )と BSA、PUM1dC もしくは PUM2dC (0.5  $\mu\text{g}$ )を  $^{32}\text{P}$  標識した dsRNA (0.625-20 fmol)  
 と混合し、15%アクリルアミドゲルで泳動した。

### 3-9 Pumilio と LGP2 との結合様式の解析

免疫沈降法により、Pumilio が LGP2 と特異的に結合していること(図 3-10)、そして、ゲルシフト法により、Pumilio が LGP2 と RNA との結合を増強していることが明らかとなった(図 3-18)。しかし、Pumilio 存在下において、LGP2 と RNA との複合体の電気泳動の移動度に変化が見られなかったことから、RNA との結合が Pumilio と LGP2 との結合に影響を与えていると考え、RNA 存在下および非存在下における Pumilio と LGP2 との結合を GST プルダウン法によって解析した。その結果、LGP2 は RNA 非存在下では Pumilio と共沈したが、RNA 存在下では共沈が確認できなかったことから、RNA 存在下では Pumilio は LGP2 から解離していることが明らかとなった(図 3-21)。

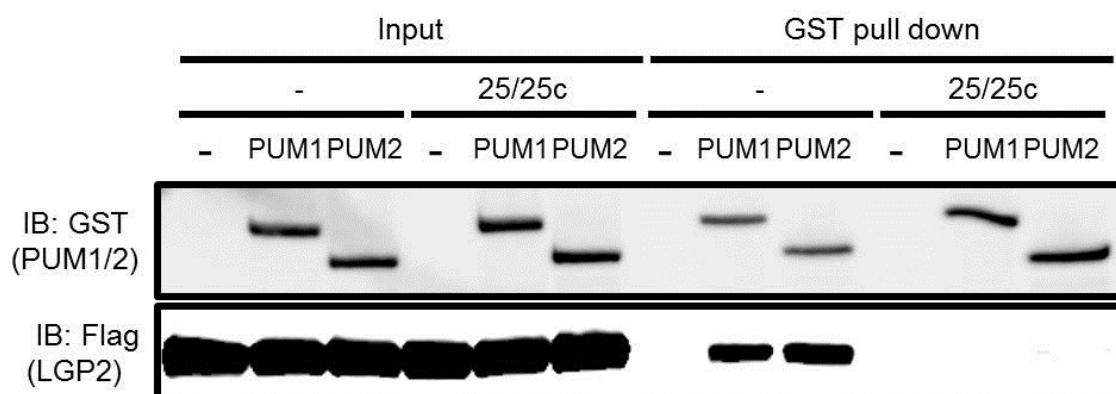


図 3-21 dsRNA 存在下、非存在下における Pumilio と LGP2 との結合能の解析  
組換え体 LGP2 (0.5  $\mu$ g) と Pumilio (0.5  $\mu$ g) を dsRNA 存在下および非存在下で混合し、GST プルダウン法で Pumilio と LGP2 との結合を調べた。

## 第四章

### 考察



#### 4-1 Pumilio の I 型 IFN 誘導能の解析

細胞内ウイルス感染センサーである RIG-I が 2004 年に同定されたのを皮切りに[11]、細胞内ウイルス感染認識機構の研究は急速に発展し、その全容は明らかとなりつつある。異常な I 型 IFN 産生は自己免疫疾患等の原因となるため[33]、その発現誘導は厳密に制御されており、定常状態における I 型 IFN の発現量は非常に低く、ウイルス感染などの刺激によって一過的に誘導され分泌される。今回われわれは、ヒト PUM1 および PUM2 を I 型 IFN 産生誘導に関わる新規分子として同定した。Pumilio は特定の mRNA の 3'UTR に結合し、翻訳を抑制する因子として同定された分子である。これまでの報告で、植物から哺乳類まで高度に保存された PUM-HD と呼ばれる領域が RNA との結合領域であること、胚発生や細胞分化、細胞周期およびミトコンドリア生合成などに関与していることが明らかとなっているが[66]、I 型 IFN 産生における機能は報告されていなかった。

ヒト Pumilio 過剰発現は、p-55C1BLuc および p-55A2Luc のレポーター活性を上昇させたことから(図 3-1)、Pumilio が IRFs および NF- $\kappa$ B 両方のシグナル伝達に関与していることが明らかとなり、Pumilio が IPS-1 から上流で機能していることが示唆された。また、siRNA により Pumilio をノックダウンすると、NDV 感染に応答した *IFNB1* mRNA および IFN- $\beta$ 産生が減弱していた(図 3-5)。これらは NDV 感染における I 型 IFN 産生誘導に Pumilio が重要な機能を果たしていることを示している。さらに、IFN- $\beta$ 遺伝子の転写に必須の転写因子である IRF-3 の二量体形成およびリン酸化状態を調べたところ、Pumilio ノックダウンによりどちらも減弱しており(図 3-6)、Pumilio が IFN- $\beta$ 遺伝子の転写後修飾に関与しているのではなく、RLR シグナル経路に直接関わっていることが強く示唆された。Pumilio ノックアウトマウスはすでに作製され、生殖細胞における機能が報告されているが[51]、抗ウイルス自然免疫応答における役割は明らかとなっていない。そのため、ノックアウトマウスを用いた生理的機能解析や CRISPR/Cas9 システムを用い、培養細胞におけるノックアウト細胞およびノックイン細胞の解析を行うことにより、Pumilio の I 型 IFN 産生誘導における詳細な機能を明らかにすることが今後の課題である。

#### 4-2 Pumilio の翻訳抑制と I 型 IFN 産生誘導

PUM-HD のヒスチジンをアラニンに置換した変異体(PUM1 H972A、PUM2 H850A)を用い、NDV 感染に応答した IFN- $\beta$ プロモーター活性を測定したところ、野生型 Pumilio と同程度の IFN- $\beta$ プロモーター活性の増加が確認された(図 3-3)。PUM2 において、この点変異体は NRE に対する結合能が欠失しており、翻訳抑制も確認できなかったことが

ら[65]、Pumilio の翻訳抑制と I 型 IFN 産生誘導は独立した機能であると示唆される。一方、これら点変異体は NRE への結合能を欠失しているが、合成 RNA である poly I:C への結合能は失われていなかったことから(未発表データ)、Pumilio の RNA 結合能自体が I 型 IFN 産生誘導に関与しているかどうかは明らかではない。これまでの報告で、シロイヌナズナでは Pumilio の一つである APUM5 がキュウリモザイクウイルスのウイルス RNA に直接結合し、翻訳を抑制することで増殖を制御していることが明らかとなっている[60]。このことはヒト PUM1 および PUM2 もまたウイルス RNA に直接結合する可能性を示唆しており、Pumilio の RNA 結合能を詳細に解析することで、Pumilio の RNA 結合と I 型 IFN 産生誘導との相関性が明らかにできると考えられる。また、次世代シーケンサーを用いた解析等により、ウイルス感染時に Pumilio に結合している RNA の同定および Pumilio 存在下、非存在下における LGP2 に結合している RNA を同定することが必要である。

#### 4-3 Pumilio と I 型 IFN 誘導シグナル分子との相互作用

NDV 感染は主に RLR の一つである RIG-I によって検知され、I 型 IFN の産生を誘導していることが明らかとなっている[12,13]。Pumilio と I 型 IFN 誘導シグナル分子との相互作用を免疫沈降法で解析したところ、Pumilio は LGP2 と特異的に相互作用していることが明らかとなった(図 3-10)。LGP2 はその詳細な分子機構は明らかではないものの、RIG-I および MDA5 シグナルを調節する分子であることが明らかとなっていることから[14]、Pumilio が RIG-I を介した NDV 感染シグナルだけでなく、MDA5 を介したシグナル伝達に関与している可能性が示唆される。本研究では NDV 感染における Pumilio の I 型 IFN 産生誘導に焦点を当てて解析を行ったが、今後は MDA5 の認識する EMCV など、他のウイルス感染において Pumilio がどのような機能を果たしているか明らかにしていく必要がある。また、Pumilio と IPS-1 および TRIM25 との結合が確認できなかったことから(図 3-10)、Pumilio はこれらアダプター分子やシグナル調節因子の活性を制御しているのではなく、RLRs と同じく感染の検知の段階で機能している可能性が高いと考えられる。

さらに、Pumilio と LGP2 は Pumilio の N 末端領域と LGP2 のヘリカーゼドメインとで相互作用していることが欠損変異体の解析から明らかとなった(図 3-11)。今後、相互作用に必要な最小領域を決定し、点変異体を作製することなどによって、Pumilio と LGP2 との相互作用が I 型 IFN 産生誘導に重要であることを明らかにしていく必要がある。

免疫沈降法により、PUM1 と PUM2 も相互作用していることが明らかとなった(図 3-12)。このことは、PUM1 と PUM2 がヘテロ二量体を形成している可能性を示唆するものであるが、実際に PUM1 と PUM2 とがヘテロ二量体を形成して機能しているかは明らかではない。PUM1 と PUM2 が相互作用している領域を特定するとともに、LGP2 の dsRNA 結合能解析においても、PUM1 と PUM2 存在下でどのような変化が生じるか観察し、組換え体タンパクを用いたゲル濾過クロマトグラフィー等により、ヘテロ二量体形成とその機能を明らかにしていくことが求められる。

これまでの報告で、LGP2 は RIG-I および MDA5 と相互作用することが明らかとなっており[69]、ウイルス感染刺激に応答して、RIG-I、MDA5 および LGP2 が avSGs へ局在することを報告してきた[54]。これらのことから、Pumilio は LGP2 を介して RIG-I および MDA5 と相互作用している可能性が示唆された。今回われわれは過剰発現系で解析を行ったが、より詳細に相互作用を解析するため、内在性タンパクでの免疫沈降を行う必要があると考えられる。

#### 4-4 Pumilio の細胞内局在と avSGs

これまでわれわれの研究グループは、RLRs を始め PKR や RNase L、DHX36 など、抗ウイルス自然免疫応答に重要な分子が、ウイルス感染刺激によって細胞質で凝集体(avSGs)を形成していることを明らかにし、avSGs がウイルス RNA 検知の場となっている可能性を示してきた[54,55]。免疫染色の結果から、RLRs や PKR などと同様に、Pumilio もまたウイルス感染に応答して avSGs に局在することが明らかとなった(図 3-15)。インフルエンザウイルスの場合、そのゲノム RNA もまた avSGs に局在しており、RIG-I の活性化に必須の分子である TRIM25 もまた avSGs に局在することから、avSGs がウイルス RNA 検知の場となっている可能性が高いと考えられる。今後、蛍光 *in situ* hybridization 法等を用い、NDV のウイルス RNA の局在を調べることで、NDV 感染における avSGs の重要性を明らかにしていく必要がある。

過去の報告で、PUM2 が SG 形成に重要であり、PUM2 をノックダウンすると酸化ストレスに応答した SG 形成が阻害されることが示された[68]。一方、今回の結果では、Pumilio ノックダウンは avSG 形成も LGP2 の avSGs への局在にも影響を及ぼさないことが明らかとなった(図 3-16)。これは、過去の報告では神経細胞を用いていたが、今回われわれは HEK293T 細胞を用いたことが原因の一つとして考えられる。神経細胞において PUM2 は重要な機能を果たしていることが明らかとなっているため、酸化ストレスに応答した SG 形成においても重要であると推察される。

また、Pumilio の C 末端領域の PUM-HD がウイルス感染に応答した avSGs への局在に十分であり(未発表データ)、Pumilio と特異的に結合していた LGP2 の欠損細胞においても、Pumilio の avSGs への局在が確認できた(図 3-16)。このことから、Pumilio は C 末端の PUM-HD を介して avSGs への局在に必要な分子と結合している可能性が示唆された。今後、免疫沈降法および質量分析法を用いたスクリーニングによって PUM-HD 特異的に結合している分子を同定する必要があると考えられる。

#### 4-5 Pumilio と LGP2 の *in vitro* における生化学的機能解析

今回われわれは、組換え体タンパクを用いた生化学的機能解析により、Pumilio が LGP2 の dsRNA 結合能を増強していることを明らかにした(図 3-18)。LGP2 によるウイルス感染認識機構は未だ明らかとなっていないため、LGP2 の dsRNA 結合と I 型 IFN 産生との相関性は明らかではない。LGP2 欠損マウスでは EMCV や NDV 感染に応答した I 型 IFN 産生が減弱しており、LGP2 は RIG-I および MDA5 を介した I 型 IFN 産生に重要な役割を果たしていることが報告されている[14]。さらに、これまでの報告により、LGP2 は RIG-I および MDA5 と相互作用することも知られている[69]。これらのことから、LGP2 の dsRNA 結合能を増強させることが、I 型 IFN 産生の促進につながるという可能性が考えられる。また、今回解析に用いた dsRNA は 25 塩基対の短い dsRNA であるため、今後はより長い RNA やウイルス RNA を用いて解析を行い、Pumilio と LGP2 によるウイルス RNA 認識機構の詳細を明らかにしていく必要がある。

さらに、組換え体タンパクを用いた GST プルダウン法により、Pumilio と LGP2 との結合は、dsRNA の LGP2 への結合により阻害されることが明らかとなった(図 3-21)。今回用いた 25 塩基対の dsRNA は、Pumilio への結合を示さなかったことから、dsRNA の結合が LGP2 の構造変化を引き起こし、その結果 Pumilio が LGP2 から解離したのではないかと推察される。次世代シーケンサーを用いた解析等により、Pumilio に結合している RNA を明らかにした上で、そのような RNA を用いた際の Pumilio-LGP2 複合体の解析を行う必要がある。

以上の結果から、われわれは図 4 のような Pumilio と LGP2 によるウイルス RNA 認識モデルを提唱した。

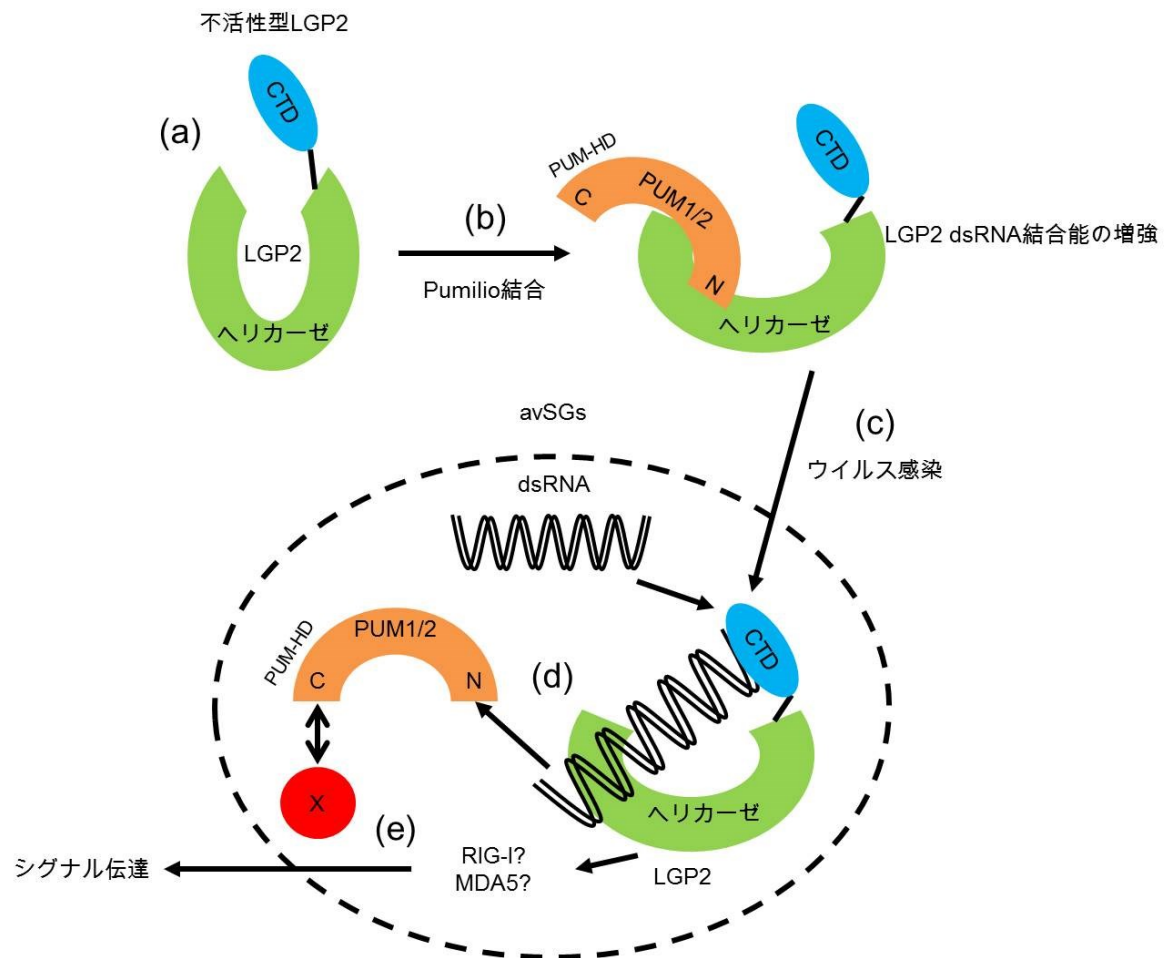


図4 Pumilio と LGP2 によるウイルス RNA 認識モデル

ウイルス非感染時には LGP2 と Pumilio は複合体を形成して細胞質に局在しており、Pumilio の結合は、恐らく LGP2 の構造変化を引き起こし、RNA を認識しやすい状態にしているものと考えられる(a、b)。ウイルス感染時には、その増殖や複製過程で生じた非自己のウイルス RNA が細胞質に蓄積し、avSGs が形成され、種々の抗ウイルス分子が avSGs に凝集する(c)。ウイルス RNA の LGP2 への結合は Pumilio の解離を誘導し(d)、LGP2 は RIG-I や MDA5 を介して下流のアダプター分子 IPS-1 へシグナルを伝達する(e)。X; PUM-HD を介して Pumilio と結合し、avSGs への局在に必要な未知の分子。

#### 4-6 今後の展望

本研究結果から、RNA 結合タンパクである Pumilio が NDV 感染による I 型 IFN 産生誘導に重要な分子として同定された。また、Pumilio は LGP2 と特異的に相互作用しており、Pumilio と LGP2 による新たなウイルス RNA 認識機構の存在が明らかとなった。

NDV 感染においては、ヒト PUM1 および PUM2 はどちらも LGP2 を介して I 型 IFN 産生を誘導していることが明らかとなったが、図 3-9a に示すように、ウイルスの種類によって I 型 IFN 産生に違いが確認された。ヒト PUM1 と PUM2 は高度に保存されているが、C 末端領域の PUM-HD は 90% のアミノ酸相同性を示すことから、比較的相同性の低い N 末端領域にこのような違いを生じる原因があるのではないかと推察される。今後は、PUM1 と PUM2 の N 末端領域と結合する因子の解析や Pumilio に結合している RNA の解析等、PUM1 と PUM2 の機能の違いを詳細に解析する必要がある。

また、LGP2 を介した I 型 IFN 産生誘導機構の詳細は未だ明らかとなっていない。NDV 感染においては、Pumilio は LGP2 を介して I 型 IFN の産生を誘導することから、Pumilio と LGP2 によるウイルス RNA 認識機構を明らかにするためには、LGP2 による I 型 IFN 産生誘導機構も明らかにする必要があると考えられる。LGP2 はシグナルドメインである CARD を欠失しているため、少なくとも単独では下流にシグナルを伝達することはできない。このことから、LGP2 は RIG-I や MDA5 と協調的に機能しているものと推察される。そこで、RIG-I や MDA5 の組換え体タンパクを用い、*in vitro* 再構成系による IRF-3 二量体形成の解析や、原子間力顕微鏡を用いた IPS-1 フィラメント状構造体の解析など、*in vitro* における生化学的機能解析を行い、LGP2 が RIG-I および MDA5 とどのような分子機構で協調的に機能しているか明らかにしていくことが今後の重要な課題である。

さらに、LGP2 による I 型 IFN 産生誘導機構が明らかではないために、LGP2 のリガンドがどのような RNA であるのかも明らかとなっていない。そこで、ウイルス感染時に LGP2 と結合している RNA を、次世代シーケンサーを用いた解析によって明らかにし、LGP2 のリガンド RNA の同定および Pumilio との相関性についても解析を行うことが求められる。

## 文献

1. Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34: 637-650.
2. Yoneyama M, Fujita T (2009) RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunological reviews* 227: 54-65.
3. Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 147: 258-267.
4. Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC (1957) Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 147: 268-273.
5. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *The Journal of general virology* 81: 2341-2364.
6. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, et al. (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature immunology* 4: 63-68.
7. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, et al. (2007) Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *The Journal of biological chemistry* 282: 7576-7581.
8. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE (1987) Interferons and their actions. *Annual review of biochemistry* 56: 727-777.
9. Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews Immunology* 6: 644-658.
10. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, et al. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3516-3521.
11. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, et al. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature immunology* 5: 730-737.
12. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, et al. (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23: 19-28.
13. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, et al. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105.
14. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, et al. (2010) LGP2 is a positive

- regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 1512-1517.
15. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of immunology* 175: 2851-2858.
  16. Peisley A, Wu B, Yao H, Walz T, Hur S (2013) RIG-I forms signaling-competent filaments in an ATP-dependent, ubiquitin-independent manner. *Molecular cell* 51: 573-583.
  17. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, et al. (2013) Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 152: 276-289.
  18. Sun Q, Sun L, Liu HH, Chen X, Seth RB, et al. (2006) The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24: 633-642.
  19. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, et al. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nature immunology* 6: 981-988.
  20. Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, et al. (2006) Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *The Journal of experimental medicine* 203: 1795-1803.
  21. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, et al. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437: 1167-1172.
  22. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122: 669-682.
  23. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, et al. (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Molecular cell* 19: 727-740.
  24. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, et al. (2011) MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146: 448-461.
  25. Xu H, He X, Zheng H, Huang LJ, Hou F, et al. (2014) Structural basis for the prion-like MAVS filaments in antiviral innate immunity. *eLife* 3: e01489.
  26. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, et al. (2010) Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS pathogens* 6: e1001012.
  27. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, et al. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314: 994-997.



28. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, et al. (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine* 205: 1601-1610.
29. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, et al. (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314: 997-1001.
30. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, et al. (2009) Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of virology* 83: 10761-10769.
31. Takahashi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Shigemoto T, et al. (2009) Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *The Journal of biological chemistry* 284: 17465-17474.
32. Deddouche S, Goubau D, Rehwinkel J, Chakravarty P, Begum S, et al. (2014) Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *eLife* 3: e01535.
33. Ivashkiv LB, Donlin LT (2014) Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews Immunology* 14: 36-49.
34. Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, et al. (2014) Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity* 40: 199-212.
35. Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, et al. (2014) Aicardi-Goutieres syndrome is caused by IFIH1 mutations. *American journal of human genetics* 95: 121-125.
36. Kato H, Takahashi K, Fujita T (2011) RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunological reviews* 243: 91-98.
37. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, et al. (2007) TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446: 916-920.
38. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T (2009) Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *The Journal of biological chemistry* 284: 807-817.
39. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, et al. (2010) The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell host & microbe* 8: 496-509.

40. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, et al. (2007) Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7500-7505.
41. Friedman CS, O'Donnell MA, Legarda-Addison D, Ng A, Cardenas WB, et al. (2008) The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO reports* 9: 930-936.
42. Kayagaki N, Phung Q, Chan S, Chaudhari R, Quan C, et al. (2007) DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science* 318: 1628-1632.
43. Lin R, Yang L, Nakhaei P, Sun Q, Sharif-Askari E, et al. (2006) Negative regulation of the retinoic acid-inducible gene I-induced antiviral state by the ubiquitin-editing protein A20. *The Journal of biological chemistry* 281: 2095-2103.
44. Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, et al. (2012) Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* 36: 959-973.
45. Vilaysane A, Muruve DA (2009) The innate immune response to DNA. *Seminars in immunology* 21: 208-214.
46. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, et al. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448: 501-505.
47. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, et al. (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature immunology* 11: 997-1004.
48. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, et al. (2011) The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nature immunology* 12: 959-965.
49. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ (2013) Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339: 786-791.
50. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, et al. (2013) Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339: 826-830.
51. Chen D, Zheng W, Lin A, Uyhazi K, Zhao H, et al. (2012) Pumilio 1 suppresses multiple activators of p53 to safeguard spermatogenesis. *Current biology : CB* 22: 420-425.
52. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell* 36: 932-941.
53. Kedersha N, Ivanov P, Anderson P (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends in biochemical sciences* 38: 494-506.
54. Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, et al. (2012) Critical role of an

- antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS one* 7: e43031.
55. Yoo JS, Takahasi K, Ng CS, Ouda R, Onomoto K, et al. (2014) DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. *PLoS pathogens* 10: e1004012.
  56. Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, et al. (2003) The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Current biology : CB* 13: 286-296.
  57. Forbes A, Lehmann R (1998) Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* 125: 679-690.
  58. Murata Y, Wharton RP (1995) Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell* 80: 747-756.
  59. Parisi M, Lin H (1999) The *Drosophila* pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis. *Genetics* 153: 235-250.
  60. Huh SU, Kim MJ, Paek KH (2013) Arabidopsis Pumilio protein APUM5 suppresses Cucumber mosaic virus infection via direct binding of viral RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 779-784.
  61. Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, et al. (2008) Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Molecular cell* 29: 428-440.
  62. Mori M, Yoneyama M, Ito T, Takahashi K, Inagaki F, et al. (2004) Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *The Journal of biological chemistry* 279: 9698-9702.
  63. Fujita T, Nolan GP, Ghosh S, Baltimore D (1992) Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes & development* 6: 775-787.
  64. Sonoda J, Wharton RP (1999) Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes & development* 13: 2704-2712.
  65. Friend K, Campbell ZT, Cooke A, Kroll-Conner P, Wickens MP, et al. (2012) A conserved PUF-Ago-eEF1A complex attenuates translation elongation. *Nature structural & molecular biology* 19: 176-183.
  66. Wang X, McLachlan J, Zamore PD, Hall TM (2002) Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* 110: 501-512.
  67. Morris AR, Mukherjee N, Keene JD (2008) Ribonomic analysis of human Pum1 reveals

- cis-trans conservation across species despite evolution of diverse mRNA target sets.  
Molecular and cellular biology 28: 4093-4103.
68. Vessey JP, Vaccani A, Xie Y, Dahm R, Karra D, et al. (2006) Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules.  
The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26: 6496-6508.
69. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, et al. (2007) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 582-587.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学研究分野 藤田尚志教授、加藤博己准教授に多大なる研究指導を賜りました。また、千葉大学真菌医学研究センター 感染免疫分野 米山光俊教授、平井玲子研究員には研究指導の他、様々な御助力を賜りました。学習院大学 理学部生命科学科 高橋清大助教、大阪市立環境科学研究所 山元誠司研究員、京都大学ウイルス研究所 分子遺伝学研究分野 村上絵津技官、平野恵未技官には本研究に御助力いただきました。藤田研究室の皆様には、研究生生活の他、日常生活においても多大な御支援を賜りました。ここに深く御礼、感謝申し上げます。

最後に、これまで私を育て、大学院まで進学することを応援し、支援してくれた父と母、兄に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Ryo Narita, Kiyohiro Takahasi, Etsu Murakami, Emi Hirano, Seiji P. Yamamoto,  
Mitsutoshi Yoneyama, Hiroki Kato and Takashi Fujita

A Novel Function of Human Pumilio Proteins in Cytoplasmic Sensing of Viral Infection  
PLoS Pathogens, 10, e1004417, 2014